SERIE A No. 1137
No. D'ORDRE: 1162

THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

PAR

FUENTES LEIVA LUIS

1° THESE. — "Facteur accesoire et seroneutralisation. Etude de son action sur la seroneutralisation du virus sindbis".

2° THESE. — Propositions données par la Faculté. "D. N. A. mitochondrial".

25 NOV. 1965

SOUTENUES LE DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. THOMAS — Président
HOLLANDE — Examinateurs
HANNOUN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546824_0059

SERIE A No. 1137
No. D'ORDRE: 1162

THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

PAR

FUENTES LEIVA LUIS

1º **THESE.** — **"Facteur accesoire et seroneutralisation. Etude de son action sur la seroneutralisation du virus sindbis".**

2º **THESE.** — **Propositions données par la Faculté. "D. N. A. mitochondrial".**

SOUTENUES LE DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. THOMAS **Président**

HOLLANDE
HANNOUN **Examinateurs**

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

(JANVIER 1965)

FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

DOYEN . . . . . M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure
PRENANT	T Anatomie et histologie comparée
GRASSE	T Evolution des êtres organisés
PREVOST	T Chimie organique
WYART	T Minéralogie et cristallographie
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T Physique quantique et relativité
MONNIER	T Physiologie générale
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique ENS
CARTAN	T Mathématiques ENS
LAFFITTE	T Chimie générale
N...	T Géométrie supérieure
COULOMB	T Physique du globe
COUSIN (Mlle)	T Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T Chimie minérale
BOCQUET	T Zoologie
KASTLER	T Physique ENS
EPHRUSSI	T Génétique
RIVIERE	T Géologie SPCN et sédiment (Orsay)
GAUTHERET	T Biologie végétale PCB
LUCAS R.	T Recherches physiques
THOMAS A.	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée
MORAND	T Physique enseignement
SOLEILLET	T Physique PCB
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T Zoologie
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosph.
GALLIEN	T Embryologie
EICHORN	T Botanique
DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN
CAUCHOIS (Mlle)	T Chimie physique
THELLIER	T Physique du globe
L'HERITIER	T Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T Mécanique générale

DU BREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électrique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurelle
JACQUINOT	T	Spectroscopie et phys. céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et cristallographie
J. P MATHIEU	T	Physique optique
COUTEAUX	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et phys. Math.
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique
NORMANT	T	Synthèse organique
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique ENS
DUGUE	T	Statistique mathématique
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
LE BRETON (Mlle)	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANCON	T	Physique SPCN
GLANGEAUD	T	Géographie physique et géologique
DODEMENT	T	Mathématiques MGP
PISOT	T	Technique mathématique de la physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMANN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique MGP
RIZET	T	Génétique (Orsay)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
MME TONNELAT	T	Physique théorique

DIXMIER	T	Mathématiques MPC
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
M. LEVY	T	Phys. théor. des hautes énergies (Orsay)
CHAIX (Mme)	T	Chimie biologique
MME HUREL PY	T	Biologie végétale PCB
PANNETIER	T	Chimie générale
BRUN	T	Mécanique des fluides I
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay)
DUBREIL (Mme)	T	Mathématiques (agrégation)
LELONG (Mme)	T	Mathématiques II ENS
BELLAIR	T	Géologie SPCN
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J. E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie ENS
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale
CASTAING	T	Physique II thermodynamique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay)
CHARNIAUX-COTTON - Mme	T	Evolution des êtres organisés
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Phys. nucléaire et radioactivité (Orsay)
TONNELAT	T	Biologie physico chimique (Orsay)
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie PCB
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biologie végétale SPCN (Orsay)
ROLLET	T	Chimie minérale
JOSIEN (Mlle)	T	Chimie SPCN
CHEVALLEY	T	Géomét. algébr. et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay)
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Phys. des parts. fondamentales (Orsay)
BRICARD	T	Météorologie et Phys. de l'atmosphère

ALBE FESSARD (Mme)	T	Psycho-physiologie
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay)
M. JULIA	T	Etude des moléculaires complexes
LENDER	T	Biologie animale SPCN (Orsay)
MAGAT	T	Physico chimie des radio-éléments
QUINTIN (Mlle)	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay)
DE POSEEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
LEMEE	T	Ecologie végétale (Orsay)
GUERIN	T	Chimie MPC (Orsay)
CHATELET	T	Chimie PCB
JEAN	T	Physiologie nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique SPCN
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
BOUSSIERES	T	Radiochimie
COUTURE (Mme)	T	Thermodynamique et mécanique phys.
ELLEMBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
FRANC	T	Biologie animale PCB
SCHNELL		Botanique tropicale
STLKOWSKI	T	Physiologie végétale
ACHER	T	Chimie biologique
BAUDOIN	T	Biologie animale PCB
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT		Geophysique ionosphère
BOUREAU	T	Botanique
CURIE D.		Physique MGP
DURAND DELGA	T	Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX	T	Géologie SPCN
MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la phys. nucléaire
FOURCROY (Mlle)	T	Biologie végétale PCB
CHOQUET (Mme)		Mécanique analytique et mécanique céleste
VEIL (Mlle)	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
LACOMBE	T	Métal. des métaux nucléaires (Orsay)
BROCHARD	T	Physique PCB (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématique I (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)

CAIRE		Géograp. phys. et géograp. dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides
CORABOEUF	T	Physiologie animale (Orsay)
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale PCB
MALGRANCE		Chimie SPCN (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Technique mathématique de la Phys. (Orsay)
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE	T	Physique ENS (Orsay)
JILLIEN J.	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Mathématiques ENS féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Mécanique céleste
ABELES		Physique SPCN
AMAT	T	Physique PCB
AUBOIN	T	Géologie
BENOIT-GUETAL (Mme)	T	Phys. nucléaire et radioactivité (Orsay)
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
BRUHAT	T	Mathématiques MPC
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay)
CHABBAL	T	Physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS	T	Mathématiques propédeutique
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay)
FURON	T	Géologie SPCN
GANS (Mme)	T	Génétique
GENEVES		Biologie animale PCB
GUILBERT		Physique CUS (Orléans)
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie PCB
MEYER	T	Physique propédeutique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER		Pétrographie
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Electronique
SILBER	T	Chimie PCB
UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques
HERVE	T	Mathématiques
NERON	T	Mathématiques MPC (Orsay)
PECKER WIMEL (Mme)	T	Astrophysique
BALKANSKY		Physique MPC
LE CORRE	T	Electricité

DELCROIX	T	Physique théorique (Orsay)
GOURDIN		Phys. théor. des hautes énergies (Orsay)
LEHMANN	T	Phys. expérimental des hautes énergies
NATAF	T	Phys. nucléaire et radioactivité (Orsay)
ECHALIER		Biologie animale PCB
BARRAUD		Physiologie cellulaire
LIORET		Physiologie végétale (Orsay)
DARS		Géol. structurale et géologie appliquée
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
BLAQUIERE		Electronique (Orsay)
ARNOUS	T	Physique théorique
TATIBOUET		Chimie (CSU Orléans)
MALLIEVIN	T	Mathématiques propédeutique (Orsay)
GAUDEMAR		Chimie propédeutique
PEREZ Y JORBA		Phys. Exp. des hautes énergies (Orsay)
DAVID	T	Chimie (agrégation d'Orsay)
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
LAZARD		Mathématiques MPC
MOREL PIERRE		Physique MPC
ARSAC		Programmation
LEFEBVRE		Chimie MPC
CHAPEVILLE		Biochimie
BENOIT		Physique CPEM
RIO		Chimie CPEM
JAUZEIN		Géologie ENS
PREVOST GEOR		BV CPEM
FAVARD P.		BA CPEM
VILKAS		Chimie CPEM
FICINI (Mlle)		Chimie CPEM
LEQUEUX		Astronomie
COHEN TANNOUDJI		Physique CPEM
TAVERNIER		Physique CPEM
ROIZEN (Mme)		BA SPCN
DURAND M.		BA CPEN
PASCAUD		Physiologie
PETIT (Mme)		BA CPEN
BROUSSE		Géologie (Orsay)
CAGNIAC		Physique agrégation (Orsay)
LEBERRE		Zoologie (Orsay)
SCHEFFER		Microbiologie (Orsay)
DE GENNES		Physique des solides (Orsay)
RIOU		Phys. nucléaire expérimentale (Orsay)
CLAUSER		Chimie biologique (Orsay)
CHEVALIER		Physiologie animale (Orsay)
JANCOVICI		Physique atomique (Orsay)
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire (Orsay)

FETIZON	Chimie propédeutique (Orsay)
CERF	Mathématiques (Orsay)
LURCAT	Physique
RIGAUDY	Chimie SPCN
SIGWALT	Chimie SPCN
FOURNET	Electricité générale
COLLONGUES	Chimie CPEN
DUBERT	Biochimie
LAVOREL	Biologie physico chimique
MOREL F.	Physiologie comparée
TALBOT	Génétique chimique
NOUGAREDE (Mme)	Botanique
FRANCOIS	Zoologie
IVANOFF	Océanographie physique
CADIOT	Chimie organique
BARUCH	Physique propédeutique
NOZIERES	Physique générale
BOK	Physique propédeutique
SLONIMSKI	Génétique

LE SECRETAIRE GENERAL
R. POULAIN

A MA FAMILLE

A Monsieur le Professeur TREFOUEL,

Directeur de l'Institut Pasteur,
Membre de l'Académie de Médecine,
Membre de l'Académie des Sciences,

A Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX,
Directeur de l'Institut Pasteur,
Membre de l'Académie de Médecine,
Membre de l'Académie des Sciences,

je tiens a exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir bien voulu m'autoriser a effectuer ce travail dans leurs laboratoires de l'INSTITUT PASTEUR.

Au Docteur EYQUEM,

Chef de Laboratoire à l'INSTITUT PASTEUR,

A Mademoiselle CATEIGNE,

Chef de Laboratoire à l'INSTITUT PASTEUR,
j'exprime mes remerciements pour m'avoir orienté dès mon arrivée à l'INSTITUT PASTEUR.

A Monsieur le Professeur LEPINE

Chef de Service a l'INSTITUT PASTEUR,
Membre de l'Académie de Médecine,
Membre de l'Académie des Sciences,

Au Docteur MAURIN,
Chef de Laboratoire a l'INSTITUT PASTEUR, Service des Virus,

qui m'ont permis de me familiariser avec les techniques de base de la virologie, en témoignage de mon attachement et de ma reconnaissance.

Au Docteur PANTHIER,

Chef de Service a l'INSTITUT PASTEUR,

A Monsieur HANNOUN,

Chef de Laboratoire à l'INSTITUT PASTEUR,

qui m'ont fourni le sujet de cette présente étude et m'ont précieusement conseillé tout au long de mon travail, en témoignage de ma profonde gratitude.

A mes amis du Laboratoire des Arbovirus et du Service des Virus, qui m'ont facilité quotidiennement la tâche.

A Monsieur le Professeur THOMAS,

Professeur à la Faculté des Sciences,
Membre de l'Académie de Médecine,

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, en hommage respectueux.

A Monsieur HOLLANDE,

Professeur à la Faculté des Sciences,

qui a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury, avec toute notre reconnaissance.

SOMMAIRE

CHAPITRE I. Introduction et historique 1

CHAPITRE II. Matériel et méthodes 6

CHAPITRE III. Résultats expérimentaux

Partie A: Séroneutralisation par les techniques 1 et 2 avec fortes concentrations des réactifs.

a) Sérums très précoces 10

b) Sérums précoces 11

c) Sérums tardifs 13

d) Conclusions 16

Partie B: Séroneutralisation par la technique 3 avec des faibles concentrations des réactifs.

a) Sonche G 18

b) Souche p 19

c) Conclusions 21

Partie C: Analyse des facteurs du complément.

a) Etude de différentes fractions du complément 23

b) Conclusions 25

CHAPITRE IV. Discussion 26

CHAPITRE V. Conclusions générales 29

BIBLIOGRAPHIE 31

CHAPITRE I

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

INTRODUCTION

La réaction de séroneutralisation consiste à provoquer la combinaison de la particule virale et de l'anticorps correspondant.

Au cours du contact qui s'établit entre les deux entités, un complexe antigène-anticorps se forme. La formation de ce complexe est influencée par un grand nombre de paramètres tels que: température, pH, force ionique, forces électrostatiques, agitation moléculaire, etc. Comme résultat de cette interaction, de nombreuses particules virales sont inhibées dans leur pouvoir de se fixer à la cellule et de l'infecter. D'autres échappent à cette action et ce sont elles qui vont établir des centres d'infection. La différence entre le nombre des centres d'infection d'une préparation traitée par l'immunsérum et celui d'une autre non traitée (témoin), renseigne sur le nombre de particules virales neutralisées. Cette différence peut être mise en évidence quantitativement par plusieurs caractères comme la mortalité des animaux, la formation de lésions focales sur la membrane chorio-allantoide ou de plages sur cultures cellulaires. La méthode de cultures cellulaires s'est avérée être la technique de choix. Bien qu'il n'existe aucun doute sur le rôle que jouent les anticorps spécifiques, il n'en est pas de même pour d'autres facteurs. En effet, dans certains cas on a parlé de l'intervention pendant la neutralisation de facteurs dits accessoires ou cofacteurs dont l'action complète ou favorise celle des anticorps. Ainsi, certains chercheurs ont décrit l'action favorable des facteurs présents dans le sérum normal frais d'espèces variées sur l'action neutralisante d'un immunsérum inactivé à 56°C pendant 30 minutes. Quelques-uns ont aussi observé une action identique sur des sérums vieillis à + 4°C. Ces constatations se sont accompagnées de l'observation que le pouvoir neutralisant d'un sérum frais est supérieur à celui du même immunsérum chauffé. Un certain facteur provoquant l'amélioration des propriétés neutralisantes d'un sérum ainsi affaibli jouerait donc un rôle durant la neutralisation.

Il faut mentionner de plus que dernièrement on a voulu établir un lien entre le rôle du facteur accessoire et un type particulier d'anticorps qui aurait besoin de lui. Autrement dit, il existerait des anticorps dépendants et d'autres non-dépendants d'un facteur accesoire. Leur nature et la date de leur apparition dans un immunsérum sont encore mal définies.

L'analyse de ce facteur au cours de la neutralisation fait l'objet de la présente étude. On tentera de préciser sa présence, sa nature et son mode d'action.

HISTORIQUE

On a beaucoup parlé dans la littérature de facteurs dits accessoires présents dans les sérums frais soit humains, soit animaux, et dont le rôle se manifeste au cours de la séroneutralisation. Les premières constatations de cet ordre remontent à 1925, lorsque Gordon (7) put prouver que le chauffage a un effet défavorable sur les immunsérums humains dont le titre neutralisant accuse alors une baisse marquée, opération d'ailleurs partiellement réversible, dit-il, par simple adjonction de sérum frais. Plus tard, Mueller (18) mit le même phénomène en évidence en utilisant cette fois le virus du sarcome de Rous et le complément de cobaye.

Ces expériences ouvrirent la voie à d'autres travaux. En 1945, Morgan (17) démontrait avec le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest que l'immunsérum chauffé perdait une partie de son pouvoir neutralisant; il mettait en même temps en évidence, d'abord que ce phénomène s'accompagnait d'une modification de l'image électrophorétique du sérum et ensuite que le taux neutralisant ne reprenait pas sa valeur initiale après addition de sérum frais (complément) ; parallèlement il observe que la conservation à $+4^{\circ}C$ occasionne aussi une perte. Cependant, en ajoutant cette fois du sérum frais (complément) on pouvait obtenir la réversibilité de l'action de la conservation et on en pouvait conclure que dans ces dernières conditions l'altération du complément était à l'origine de l'abaissement du taux neutralisant.

En 1947 avec le même virus, Wittmann (24) arrive à des conclusions identiques, en utilisant le sérum de convalescent; il signale en outre qu'une dilution au dixième provoque une chute brusque de l'activité du sérum, laquelle ne diminue pas proportionnellement aux dilutions successives; néanmoins il réussit, à la différence des auteurs antérieurs, à restituer le pouvoir altéré par le chauffage en ajoutant du complément.

Les travaux de Leymaster et Wart en 1949 (15), portant sur le virus des oreillons ont également permis de déceler une substance répondant à ces caractéristiques. En comparant l'action de la fraction d'un immunsérum qui contient le complément mais pas les anticorps à celle d'une autre fraction du même sérum renfermant les anticorps mais pas le complément, ils ont vu que chacune des neutralisations était inférieure à la neutralisation qu'on obtenait avec le sérum complet. Les sérums chauffés ont été restaurés au moyen de sérum frais de la même espèce, ce que n'avait pu obtenir Morgan.

En 1949 Dozois et coll. (2) ont repris l'étude de certains facteurs sériques sur le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest en fractionnant le com-

plément et en analysant le pouvoir des fractions manquant en C'1, C'2, C'3 ou C'^{4} au cours de la neutralisation; selon ces auteurs la fraction C'^{2} seule agit avec la même intensité que la totalité du complément et en étudiant la réaction des deux fractions réunies, on voit qu'il n'y a pas de modification de la neutralisation. Les composants C'^{3} et C'^{4} ont un pouvoir partiel.

En 1952 McCarthy et coll. (16), au cours de recherches poursuivies avec le virus de la variole cultivé sur l'oeuf embryonné, constatent également que l'inactivation à 56°C abaisse le taux de neutralisation. La réversibilité du phénomène a lieu par apport de sérum frais. Ils admettent l'existence d'un facteur sérique qui ne serait pas le complément et réfutent la notion d'une relation constante entre le taux de cette substance dans le sérum de référence et la neutralisation.

En 1950, Howitt (12) fait mention dans ses recherches sur le virus de Newcastle, d'un facteur non-spécifique et thermolabile dont le taux dans le sérum frais baisse lorsqu'il est chauffé à 44°C et devient nul à 56°C. Il a également constaté une perte du taux neutralisant avec des sérums conservés à +4°C. Ce taux varie suivant les différents sérums: il est maximun chez l'homme, le singe, le cobaye et le lapin; il est plus bas chez le poulet, le hamster et il est nul chez la souris. Cet auteur suggère que ce facteur pourrait se rapprocher de la fraction C'^{2} du complément, laquelle se présente à différents taux suivant les sérums considérés. Il a remarqué aussi une perte du pouvoir des sérums conservés à +4°C.

Dulbecco et coll. en 1956 (4) ont abordé très sérieusement les aspects fondamentaux de la séroneutralisation avec le virus de l'encéphalite équine du Vénézuéla et de la poliomyélite. Ils mettent en évidence une amélioration du pouvoir neutralisant des immunsérums chauffés en ajoutant du sérum frais de singe.

En 1959 Ginsberg et coll. (8), étudiant un problème voisin, celui de l'inactivation des virus par le système properdine, admettent que le virus de Newcastle n'est pas inactivé par un sérum depourvu à la fois de la fraction C'^{3} du complément et de la properdine; mais en ajoutant ces deux facteurs ils aboutissent à l'inactivation, à condition d'agir en présence des ions Ca++ et Mg++. D'autres exemples sont fournis par les virus de la grippe ou le phage coli T^2; on ne peut cependant dans ces conditions obtenir l'inactivation des entérovirus Coxsackie et ECHO.

Pourtant Southam et coll. (21) toujours en 1959, après avoir étudié l'action de la properdine sur la neutralisation des virus West Nile et Mengo sont arrivés à des conclusions contraires.

Karson et coll. (13), travaillant sur le virus de Newcastle, obtient son inactivation au moyen de la properdine.

Après des recherches qui ont porté sur le virus de la dengue adapté à la souris, Sabin en 1950, (20), met en évidence, lui aussi, qu'une neutralisation plus poussée est obtenue grâce à l'interaction de facteurs spécifiques et thermostables à 56°C soit les anticorps, et de facteurs non-spécifiques et thermolabiles qui s'apparentent au complément. Ces travaux paraissent démontrer la présence de facteurs non-spécifiques dans le sérum frais et identifiés au complément qui favorise l'action des immunsérums dans la neutralisation du pouvoir infectieux des virus.

Plus récemment, Toussaint et Muschel en 1962 (23), au cours de travaux sur un système différent (phages) examinant les propriétés neutralisantes des anticorps "normaux", des anticorps immuns et du complément, obtiennent la disparation du pouvoir neutralisant des anticorps "normaux" en les portant à 56°C pendant 6 minutes, phénomène qu'ils attribuent à l'inactivation de la fraction C'^2 du complément et peut-être à l'inactivation d'autres éléments. En notant que ce chauffage, même poursuivi pendant une heure, n'altère pas les propriétés des anticorps "naturels" ils admettent une interdépendance de deux facteurs et en déduisent que l'action neutralisante d'un sérum donné varie avec la nature du complément utilisé.

A la suite des études sur le cofacteur et les anticorps spécifiques contre le virus de la grippe, Styk en 1962 (22) met en évidence que la baisse par inactivation thermique du titre inhibiteur de l'hémagglutination est plus important avec le sérum précoce qu'avec le sérum tardif. La réactivation par un sérum frais est également plus marquée avec le sérum précoce; et bien qu'il ne s'agisse pas strictement là d'une recherche sur la neutralisation, il est intéressant de constater que ces sérums sont aussi altérés par le chauffage et retrouvent leurs propriétés initiales par adjonction de sérum frais.

Hashimoto et Prince, en 1963 (11) au cours d'expériences avec le virus de l'encéphalite japonaise B, arrivent à la conclusion que la neutralisation est identique en employant des sérums frais ou bien chauffés et qu'il n'y a donc pas intervention de facteurs dits thermolabiles.

Mais Yoshino et coll. (25) en 1964, travaillant sur l'herpès obtiennent des résultats tout à fait opposés à ceux des précédents; en effet ils démontrent que le complément fourni par le cobaye a une action remarquable sur les sérums inactivés par la chaleur, mais n'apportent aucune explication sur le mécanisme de la réaction ni sur l'identification de la fraction responsable.

Il faut donc admettre que, bien que la plupart des auteurs trouvent

que le chauffage altère certains types d'immunsérums en abaissant leur pouvoir neutralisant, ce phénomène n'est pas absolument démontré. Ainsi, tandis que (7), (16), (17), admettent l'action nocive du chauffage, d'autres comme (11), (19), obtiennent des résultats identiques avec ou sans chauffage. Par ailleurs deux auteurs à notre connaissance (13), (17), ont mis en évidence un effet analogue attribué à la conservation prolongée à +4°C.

D'autre part une influence favorisante sur les sérums inactivés a été décrite comme résultant de l'apport de sérum frais. Le facteur présent dans le sérum normal capable de restituer le pouvoir neutralisant perdu n'a pas été identifié de façon définitive, et si un certain nombre de travaux le rapprochent du complément avec lequel il garde certaines similitudes, d'autres auteurs nient toute ressemblance avec cette substance (16), (22), et se bornent à l'appeler "facteur accessoire" ou "co-facteur". Cependant, (12), (23), inclinent à penser qu'il s'agit de la fraction C'^2 du complément et Dozois et coll. (2) soutiennent la participation des fractions C'^2, C'^3 et C'^4. Autrement dit, si l'on admet la présence d'un facteur accessoire labile à la température de 56°C et au cours de la conservation de longue durée à +4°C, son identification reste encore incertaine.

Tout dernièrement, (25) arrive à la conclusion que le complément agit bien comme facteur accesoire et, de plus, que certains anticorps dépendent du complément pour s'exprimer tandis que d'autres en sont tout-à-fait indépendants.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1 - VIRUS - Le virus Sindbis provenant du laboratoire des Arbovirus de l'Institut Pasteur (souche EgA2 339 15 passages) entretenu sur souris blanche de race Swiss a constitué notre stock de travail. Nous avons utilisé les deux variantes, dites p à petites plages et G à grandes plages, isolées dans ce même laboratoire par Hannoun et coll., 1964 (10).

La suspension de virus maintenue en ampoules à -70°C, consiste en un broyat de cerveau de souris dilué au dixième dans le liquide de Hanks additionné de 10 p. cent de sérum de veau.

2 - CELLULES - Une culture de cellules de première explantation d'embryon de poulet de 11 jours est obtenue suivant la technique décrite par Hannoun et Panthier, 1960 (9). Après trypsination et centrifugation les cellules sont mises en culture dans des flacons de pharmacie de 60 ml. à raison de 1 ml. de la dilution au vingtième de culot cellulaire (approx. 10^7 cellules par flacon) pour 4 ml. de milieu de culture.

Après 24 heures d'incubation à 37°C une couche monocellulaire couvre toute la paroi et à la suite de deux rinçages avec la solution Hanks tiède, les cellules sont prêtes à être ensemencées.

3 - MILIEU DE CULTURE - Le milieu employé pour la mise en culture des cellules est celui recommandé par Lépine et coll. (14) à l'hydrolysat de caséine additionné de 10 p. cent de sérum de veau.

La formule du milieu gélosé pour la formation de plages est celle décrite par Hannoun et coll. (9) : vitamines 10 X de Earle, 10 ml. bicarbonate blanc 55°/°°, 17,5 ml; milieu de Parker, 50 ml.; milieu de Hanks, 50 ml.; mélange pénicilline-streptomycine, 1 ml.; eau distillée, 400 ml.

La gélose Bacto à 3% avec rouge neutre (1/10.000) est mélangée au milieu proprement dit dans la proportion de cinq parties de gélose pour six parties de milieu. Le milieu nutritif peut être préparé d'avance comme un milieu double ou bien juste avant le coulage.

4 - LIQUIDE DE DILUTION - On utilise la solution de Hanks selon la préparation 10X de l'Institut Pasteur additionnée d'antibiotiques (pénicilline= 100 U/ml. et streptomycine= 50 ug/ml.).

5 - SERUMS IMMUNS - Trois types d'immunsérums ont été employés au cours des épreuves cinétiques de neutralisation: a) le sérum de lapin, b) le sérum de souris, et c) le sérum de cobaye.

Les différents animaux ont été saignés à différents temps selon le

schéma d'immunisation décrit plus bas. Il faut distinguer les sérums récoltés précocement de ceux obtenus dans une phase plus tardive; pour cela nous les désignons par des lettres capitales qui renseignent immédiatement sur les conditions de préparation et leur provenance (TP: très précoce; P: précoce; T: tardif; L: lapin; S: souris et C: cobaye). On a ainsi des sérums tardifs de lapin dont le sigle est STL, très précoce de cobaye dont le sigle est STPC, etc.

Le schéma de préparation de chacun de ces sérums est le suivant:

a) Sérum de souris - Un lot de 20 à 25 souris a été inoculé avec des doses de 0,03 ml. de suspensión de virus à 10^{-2} par la voie intrapéritonéale, les injections se succédant toujours à une semaine d'intervalle. Après deux injections une partie du lot est saignée pour fournir le sérum dit précoce (SPS) ; l'autre partie subit quatre injections et donne le sérum tardif (STS).

b) Sérum de cobaye - Deux groupes de cobayes composés respectivement de quatre et trois individus, reçoivent des injections intradermiques à la même cadence que les souris. Après deux injections intradermiques on obtient le sérum précoce (SPC), et après quatre injections le sérum tardif (STC).

c) Sérum de lapin - Deux groupes de lapins ont été employés pour nous procurer des sérums anti-G et anti-p. Chacun d'entre eux a reçu deux injections intradermiques à dix jours d'intervalle. Des prises de sang pratiquées les huitième, quinzième et trentième jours après l'injection nous ont fourni les sérums appelés respectivement: très précoce (STPL) ; précoce (SPL) et tardif STL).

Tous les sérums ainsi préparés ont été ensayés vis-à-vis du virus homologue au moyen de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination selon Clarke et Casals (1). Les titres de chacun étaient les suivants vis-à-vis de 8 unités agglutinantes. (Voir page suivante: Tableau 1).

6 - FACTEUR ACCESSOIRE - Le complément de cobaye lyophilisé fourni par l'Institut Pasteur a servi de source de facteur accessoire. Pour séparer les fractions du complément, on a fait appel à la technique de dilution au moyen de K^2HPO^4 de Ecker et Pillemer (5). On ajoute goutte à goutte un volume de la solution de complément à 10 volumes de la solution M/200 de K^2HPO^4. Après 30 minutes de contact on centrifuge à 3.500 tours par minute pendant 15 minutes.

La fraction précipitée appelée ici "C^1" contient les éléments C'^1 + C'^3 et les deux autres composants du complément, soit C'^2 + C'^4 restent dans le surnageant (fraction appelée ici "C^2").

Le précipité est repris dans un volume de solution saline égal au volume original du complément et précipité une deuxième fois de la même façon; le produit recueilli à la fin de cette opération et dissout dans un volume égal de solution saline représente la fraction du complément $C'^1 + C'^3$ ("C^1").

Le surnageant obtenu ("C^2") est concentré par dialyse sur ultrafiltre LKB en le maintenant dans la glace fondante pendant environ dix-huit heures. On obtient alors un volume égal au volume original, qui représente la fraction $C'^2 + C'4$ ("C^2") du complément. Les deux réactifs sont distribués en ampoules qui sont conservées à —70°C jusqu'au moment de l'emploi.

TABLEAU 1

Titre inhibiteur de l'hémagglutination

Type de sérum	Abréviation	Titre
Sérum très précoce de lapin anti-p	STPLp	0
Sérum précoce de lapin anti-p	SPLp	40
Sérum tardif de lapin anti-p	STLp	640
Sérum très précoce de lapin anti-G	STPLG	80
Sérum précoce de lapin anti-G	SPLG	160
Sérum tardif de lapin anti-G	STLG	2560
Sérum très précoce de cobaye anti-p	STPCp	0
Sérum tardif de cobaye anti-G	STCG	40
Sérum précoce de souris anti-G	SPSG	40
Sérum tardif de souris anti-G	STSG	160
Sérum très précoce de cobaye anti-G	STPCG	640
Sérum tardif de cobaye anti-G	STCG	640

Le titre est exprimé par l'inverse de la dilution maximale inhibant l'hémagglutination.

METHODES

La réaction de séroneutralisation proprement dite a lieu dans des tubes à hémolyse de Kahn. Après avoir mis les composants, virus, sérum immun, sérum de cobaye (frais ou chauffé) et le diluant, en quantités variables selon le cas particulier du système et qui seront précisées plus bas, les tubes sont remis au bain-marie à 37°C. A temps variables on prélève des échantillons de 0,1 ml. qui sont recueillis dans 0,9 ml. de diluant et immédiatement portés au bain glacé. Puis chacun d'entre eux est amené à la dilution établie au préalable. On applique la méthode de plages suivant la technique décrite par Hannoun et Panthier (9) ; chaque flacon de culture, à raison de quatre flacons par dilution, étant inoculé avec 0,5 ml. d'un des mélanges, puis placé pendant une heure à l'étude à 37°C afin que l'adsorption s'effectue. A la suite de l'adsorption, l'inoculum est rejeté et remplacé par le milieu gélosé à raison de 5 ml. par boite. Après refroidissment tous les flacons sont remis à l'étuve pendant dix-huit heures (Sindbis souche G) ou vingt-quatre à trente heures (Sindbis souche p), puis l'on fait le compte du nombre de plages.

Les courbes de nautralisation sont établies en portant le titre du virus restant après la période de neutralisation exprimé en logarithmes contre le temps de réaction en minutes. Les résultats sont également exprimés sous forme des indices de neutralisation (log. de rapport Vo/Vt soit log (Vo - Vt) qui sont représentés dans le tableau 7.

Le tableau suivant 2 illustre les différentes variantes de la technique de neutralisation employée au cours des expériences. (Voir page suivante: Tableau 2).

Il faut remarquer, d'après le taubleau 2 que la concentration des composants sérum/virus était différente selon le type d'expérience. Au commencement les taux utilisés étaient très concentrés (10^{-2} pour le virus et 10^{-1} pour l'immunsérum) pour déceler d'une façon nette les différences que pourrait entrainer l'adjonction du sérum de cobaye. En diminuant la concentration, les taux de neutralisation deviennent plus faibles.

Les intervalles de temps pendant lesquels la neutralisation a été mesurée ont été de 10, 30 et 60 minutes ou bien de 1,3 et 5 minutes (sauf mention contraire).

Etant donné que nous disposons de deux souches de virus Sindbis (souche G et souche p), ainsi que de sérums de différents âges et origines, on a essayé avec les différents sérums des couples virus/immunsérum homologues (p/p ou G/G), ou bien des couples hétérologues (p/ G ou G/p). Ceci est à noter parce que certains résultats, dans le cas de composants hétérologues, s'écartent quelquefois de ce qu'on considère comme la moyenne.

Tableau 2

Schéma des protocoles
des expériences de séroneutralisation

Protocole		Dilution virus	Dilution de l'immunsérum (ImF ou ImC)		Facteur accessoire (SCF ou SCC)		Liquide de dilution
1	alpha	$0{,}1.10^{-2}$	$0{,}1.10^{-1}$	ImF	0,5	SCF	0,3
	bêta	$0{,}1.10^{-2}$	$0{,}1.10^{-1}$	ImF	0,5	SCC	0,3
2	alpha	$0{,}1.10^{-2}$	$0{,}1.10^{-1}$	ImF	0		0,8
	bêta	$0{,}1.10^{-2}$	$0{,}1.10^{-1}$	ImC	0		0,8
	gamma	$0{,}1.10^{-2}$	$0{,}1.10^{-1}$	ImC	0,5	SCF	0,3
3	alpha	$0{,}1.10^{-4}$	$0{,}1.10^{-3}$	ImF	0		0,8
	bêta	$0{,}1.10^{-4}$	$0{,}1.10^{-3}$	ImF	0,5	SCF	0,3

Les quantités sont exprimées en ml.
SCF = sérum frais de cobaye.
SCC = sérum inactivé de cobaye.
ImF = immunsérum frais.
ImC = immunsérum inactivé.

Le tableau 3 décrit la technique utilisée pour analyser l'effet des composants du complément sur la séroneutralisation. Suivant la méthode déjà décrite les prélèvements se font aux temps de 10 et 30 minutes.

Tableau 3

Shéma des protocoles des expériences
concernant l'étude des composants du complément

Protocole	Virus (10^{-1} ou 10^{-2})	Immunsérum chauffé (10^{-1})	Complément total	Fractions C^1	C^2	C^{2*}	$C^1 + C^4$
alpha	0,1 ml	0,1 ml	0	0	0	0	0
bêta	0,1 ml	0,1 ml	0,5ml	0	0	0	0
gamma	0,1 ml	0,1 ml	0	0,5ml	0	0	0
delta	0,1 ml	0,1 ml	0	0	0,5ml	0	0
epsilon	0,1 ml	0,1 ml	0	0	0	0,5ml	0
zeta	0,1 ml	0,1 ml	0	0	0	0	0,5ml

Le volume total est ramené à 1 ml. avec la solution de Hanks
$C^{2*} = C^2$ inactivée.

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A

Séroneutralisation par les techniques 1 et 2 avec fortes concentrations des réactifs

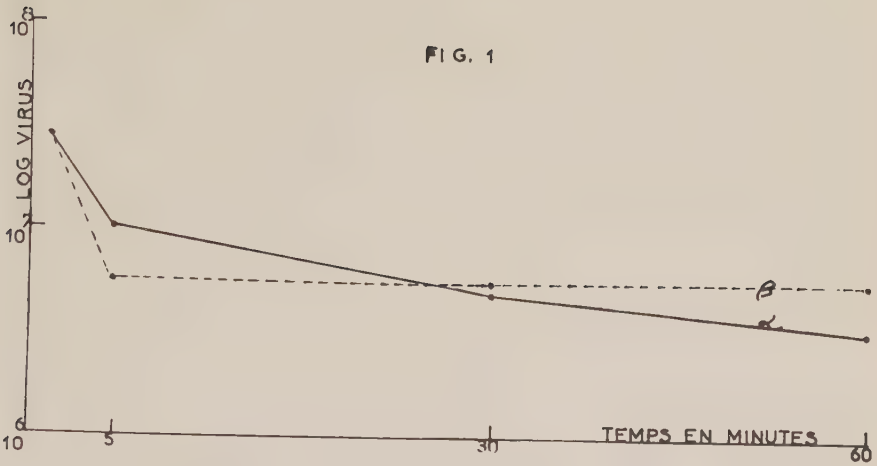
a) SERUMS TRES PRECOCES (lapin)

L'étude des sérums très précoces de lapin a été menée suivant les protocoles 1 et 2 (cf. matériel et méthodes) ; toutes les réactions, sauf une, appartiennent au groupe de neutralisation homologue (virus p contre immunsérum p ou virus G contre immunsérum G). On a procédé d'abord selon la technique 1: les figures 1 et 2 montrent les résultats de deux expériences. Il faut d'abord noter que le sérum anti-G très précoce n'est pas très puissant: le niveau atteint après les cinq premières minutes se maintient ensuite sans grand changement pendant au moins une heure. En outre, en ce qui concerne l'action du sérum de cobaye frais (SCF) ou chauffé (SCC), il semble y avoir une différence entre les expériences homologues (fig. 1) et l'expérience hétérologue (fig. 2). En effet dans la première, l'adjonction du SCF n'introduit aucune différence tout au long de la réaction, les courbes alpha et bêta étant identiques, alors que dans le deuxième cas (fig. 2), il semble y avoir une augmentation discrète de la quantité de virus neutralisée du fait de la présence du SCF.

La suite des essais avec le même type de sérum a été réalisée par la méthode 2. Les couples virus/sérum sont toujours du type homologue et nous permettent de voir (fig. 3 et 4) les faits suivants: en comparant les courbes de neutralisation on se rend compte que le sérum anti-p présente un taux de neutralisation bien superieur à celui de l'anti-G. Cependant, on ne peut mettre en évidence aucune différence d'activité entre les préparations des sérums frais ou chauffés: les courbes de neutralisation sont identiques dans chacune des deux expériences.

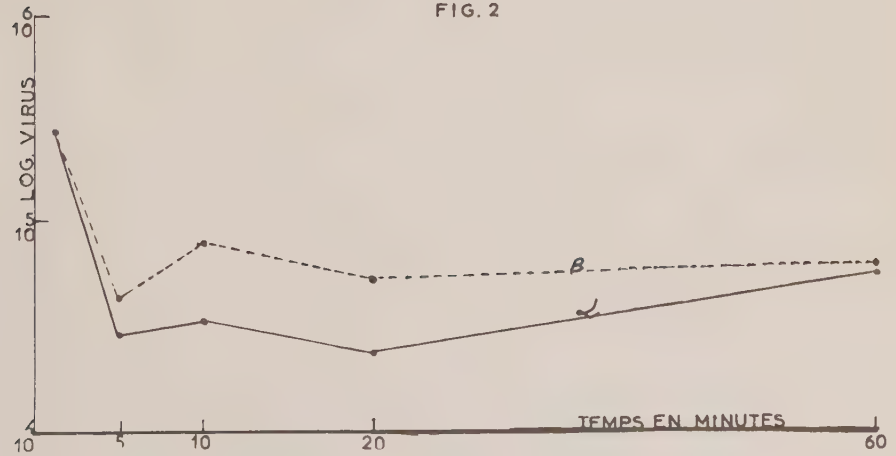
Lorsque l'on ajoute au mélange virus-immunsérum chauffé du SCF, on obtient encore un type de courbe (gamma) qui ne s'écarte pas de l'image obtenue pour alpha ou pour bêta. Autrement dit, dans le cas d'un sérum dit "très précoce de lapin" nous constatons que le chauffage n'a aucune influence sur le pouvoir neutralisant propre du sérum, et de plus, que l'addition du SCF n'accentue pas son action, à l'exception d'une légère amélioration décelée dans un couple hétérologue. En utilisant la technique 1 nous concluons que ce type d'immunsérum n'est pas dépendant pour son action neutralisante d'un facteur thermolabile, qui serait présent dans le sérum avant le chauffage ou qui serait apporté sous forme de sérum frais de cobaye (SCF).

FIG. 1



VOIR SERUMS TRES PRECOCES α. STPLG + SCF|G. β. STPLG + SCC|G.

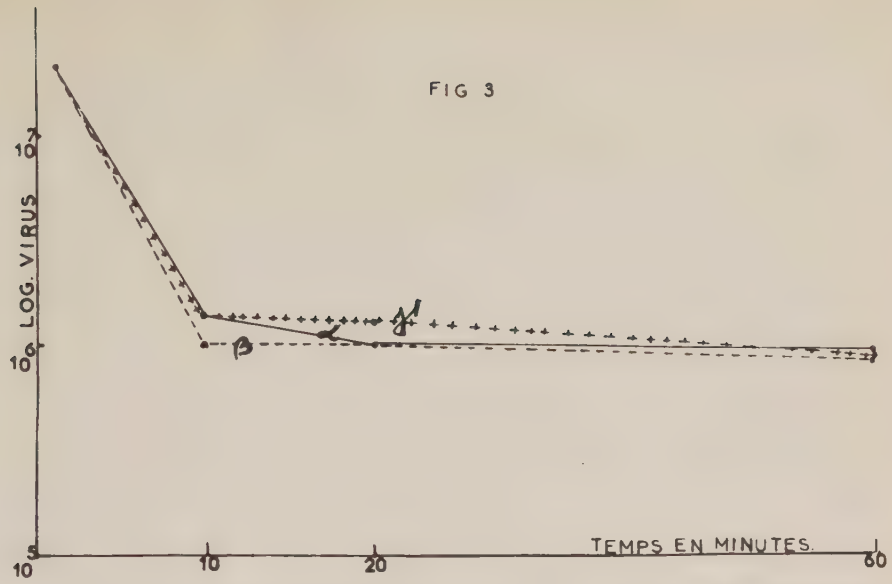
FIG. 2



VOIR SERUMS TRES PRECOCES. α. STPLG. + SCF| p.

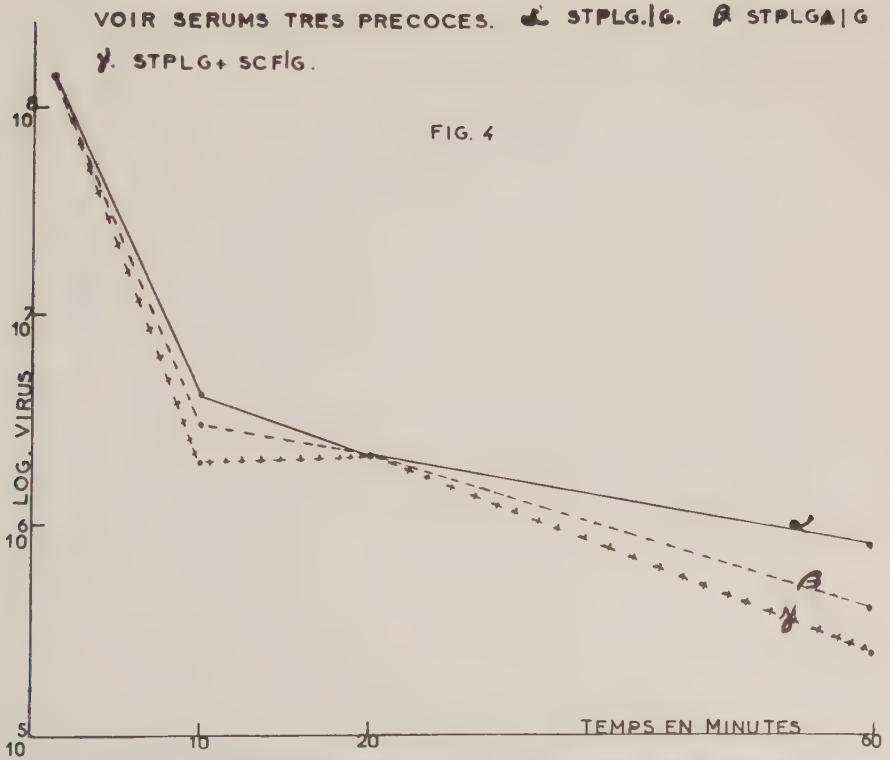
β. STPLG + SCC.|P.

FIG 3



VOIR SERUMS TRES PRECOCES. α STPLG.|G. β STPLGA|G
γ. STPLG+ SCF|G.

FIG. 4



VOIR SERUMS TRES PRECOCES. α. STPLp|p β STPLpA|p
γ. STPLpA + SCF|p

b) SERUMS PRECOCES (lapin et souris)

Les sérums précoces de ces deux espèces animales ont été analysés selon les protocoles 1 et 2 (cf. Matériel et méthodes). Dans une expérience homologue (fig. 6) et une autre hétérologue (fig. 5) utilisant le même sérum de lapin examiné selon la méthode 1, nous n'avons pas trouvé de différence du pouvoir neutralisant en présence ou en l'absence du SCF ou SCC. Les deux courbes alpha et bêta montrent une chute modérée du titre du virus pendant les premières cinq minutes de réaction puis s'infléchissent en restant jusqu'à la fin de la réaction à un niveau constant. Cela nous indique que lorsqu'on utilise un immunsérum précoce de lapin dans une réaction de neutralisation, son efficacité n'est pas du tout intensifiée par l'adjonction d'un sérum frais de cobaye; que l'on ajoute le sérum de cobaye frais ou chauffé, l'allure de la courbe de neutralisation et le résultat final sont les mêmes.

Par contre, les modalités de l'action des mêmes sérums examinés par la méthode 2 sont différentes. En effet, lorqu'un sérum précoce de lapin a été mis en contact avec l'antigène homologue (fig. 7 et 8) on obtient trois courbes différentes selon que le sérum précité agit à l'état frais, chauffé ou chauffé additionné du SCF. C'est ainsi que la courbe alpha présente une allure particulière avec une pente prononcée; au bout de dix minutes elle redevient horizontale jusqu'à la fin de l'expérience. Le même sérum chauffé montre une neutralisation à peu près équivalente puisque, descendant plus lentement, la courbe de neutralisation atteint finalement un niveau identique. Mais cette image se transforme quand on ajoute au mélange du SCF; dans ce cas (courbe gamma), la pente est légèrement plus forte au début de la réaction (10 premières minutes) et le taux de virus restant est inférieur aux deux autres. Cependant, après une heure le niveau atteint est équivalent à celui obtenu dans les conditions précédentes. De ces considérations on peut conclure que la chaleur diminue le pouvoir neutralisant apparent d' un sérum précoce de lapin; le sérum est réactivé par l'adjonction de sérum de cobaye frais et retrouve même une activité supérieure à celle qu'il avait à l'origine.

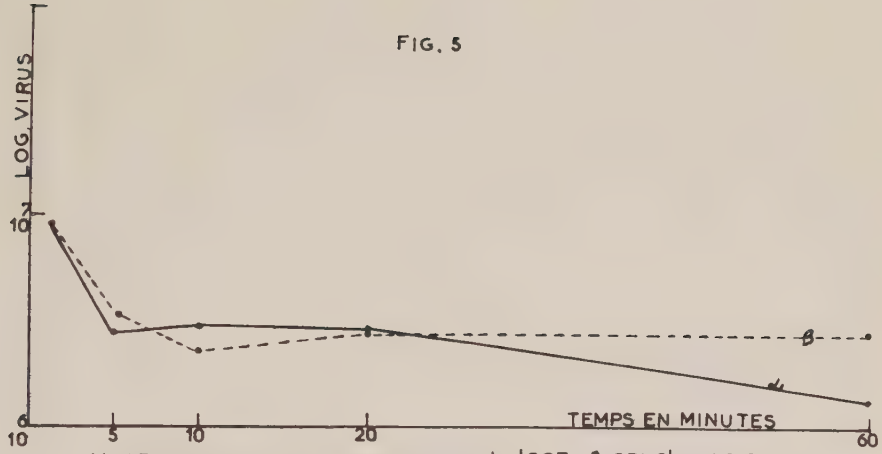
Des conclusions analogues peuvent être tirées de l'examen des sérums précoces de souris (fig. 9). Dans ce cas il s'agit d'un sérum conservé pendant plusieurs mois à +4°C. Ceci explique l'action plus faible du sérum non chauffé qui fait que les courbes alpha et bêta se rapprochent. Cependant la neutralisation se poursuit plus loin qu'avec le sérum chauffé. L'action du SCF sur ce dernier se manifeste de façon plus nette et la courbe gamma s'écarte des autres en présentant une pente prononcée alors que le niveau

du virus restant est du même ordre.

En conclusion tant pour un sérum "précoce de lapin que de souris" on décèle que l'effet de la chaleur réduit de façon remarquable le pouvoir neutralisant apparen. Un effet indentique parait imputable à la conservation à +4ºC du sérum de souris.

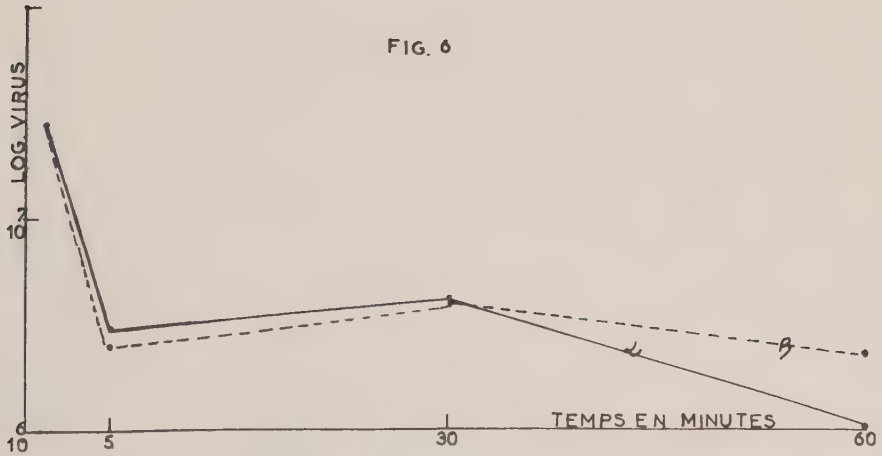
Cependant dans un cas comme dans l'autre le pouvoir neutralint est restauré lorqu'on ajoute du sérum de cobaye frais (SCF) qui semble posséder les facteurs thermolabiles nécessaires à l'expression complète du pouvoir neutralisant de ces sérums.

FIG. 5



VOIR SERUMS PRECOCES. α SPLG|P|SCF β SPLG|P + SC C,

FIG. 6



VOIR SERUMS PRECOCES. α SPLG|G + SCF β SPLG|G + SCC.

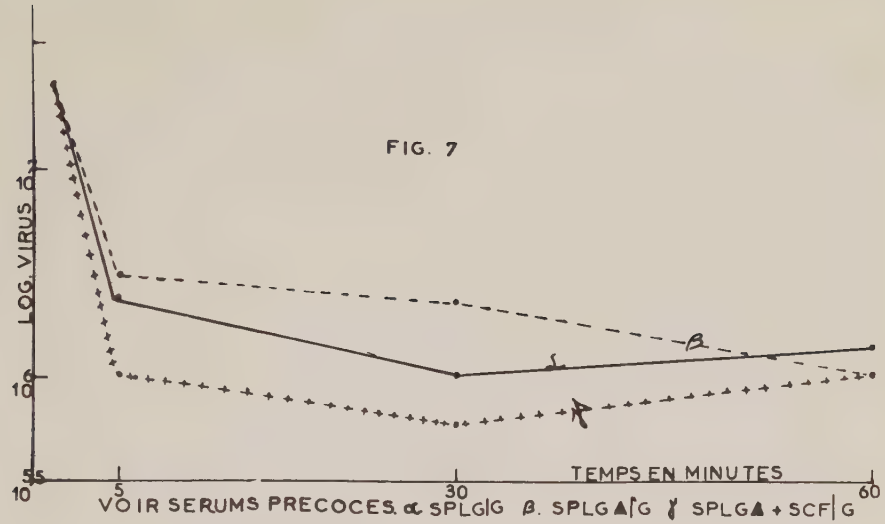


FIG. 7

VOIR SERUMS PRECOCES. α SPLG|G β. SPLGA|G γ SPLGA + SCF|G

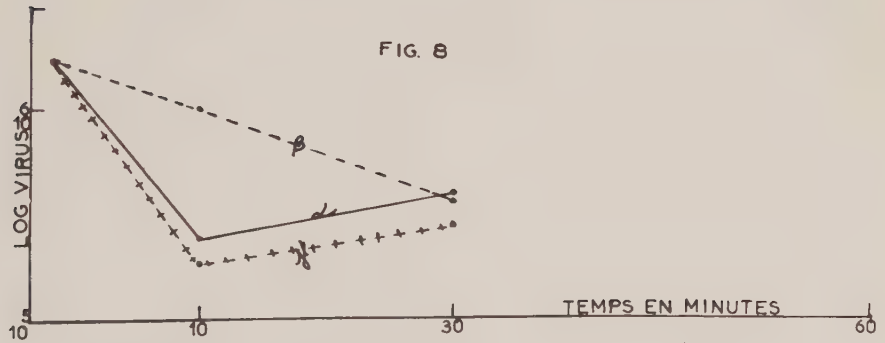


FIG. 8

VOIR SERUMS PRECOCES. α SPLP|P β SPLPA|P γ SPLPA+SCF|P

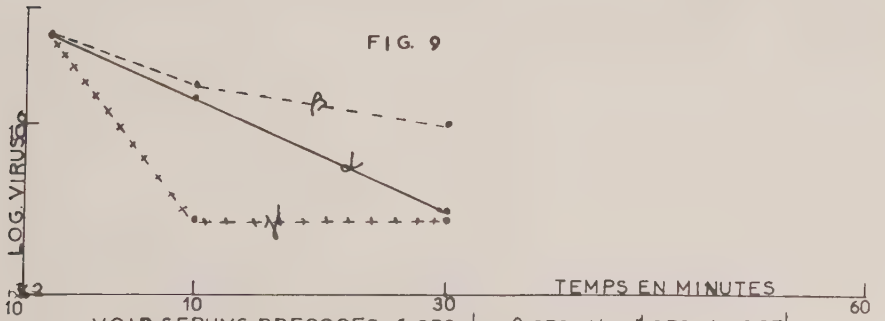


FIG. 9

VOIR SERUMS PRECOCES. α. SPSp|P β SPSpA|P γ. SPSpA + SCF|P

c) SERUMS TARDIFS (souris, cobaye et lapin)

En opérant suivant le protocole 2 (tableau 2) nous avons essayé l'action du sérum homologue tardif de souris contre la souche p. La fig. 10 montre les résultats d'une expérience de neutralisation avec les taux du virus restant aux temps de 10, 30 et 60 minutes. La courbe alpha (sérum frais), a une forte pente ce qui représente une vitesse de neutralisation très rapide avec un niveau final plus faible que la courbe bêta. La neutralisation est stable et l'index de neutralisation est de 1,7. Par contre le sérum chauffé (courbe bêta) montre une chute plus lente à faible pente et le niveau final atteint donne un index de neutralisation de 0,9. Le même sérum inactivé par la chaleur et mélangé avec le SCF (courbe gamma) retrouve sensiblement les mêmes caractéristiques que le sérum frais dans la courbe alpha, avec une vitesse de neutralisation élevée et un index de neutralisation de 1,7. Ces variations trouvent une explication satisfaisante si l'on admet: 1º que le chauffage fait perdre au sérum une partie de sa capacité neutralisante et 2º que l'adjonction de sérum frais de cobaye normal (SCF) compense cette perte en rétablissant le facteur thermolabile qui n'est donc pas un facteur immunologiquement spécifique.

Nous avons voulu vérifier ces modalités de la séroneutralisation six mois après, en opérant avec le *même sérum* conservé à +4ºC (fig. 11); nous avons constaté que l'action du sérum frais était moins intense: elle est représentée par une courbe bêta presque identique à celle du sérum chauffé, ce que nous interprétons comme une dégradation ou inactivation du sérum frais qui ne conserverait pas à la température de +4ºC son pouvoir neutralisant apparent. Néanmoins le même sérum inactivé par la conservation reprenait tout son pouvoir neutralisant lorsqu'il agissait en présence du SCF. Cette expérience démontre que la conservation à +4ºC d'un sérum tardif de souris provoque une inactivation du même type que celle accomplie par la chaleur et en outre, que cette inactivation est susceptible d'être compensée par adjonction de sérum frais de cobaye normal (SCF): on obtient alors la même "réactivation" que lorsqu'on fait l'expérience avec un sérum inactivé par la chaleur.

Nous avons réalisé une seule expérience du type homologue avec un *immunsérum de cobaye* anti-G qui avait été conservé six mois à +4°C. En observant la fig. 12 on peut noter que la courbe du sérum frais (alpha) présente une chute légèrement plus accentuée que celle du sérum chauffé, pour aboutir finalement au même niveau. Mais la conservation en réfrigérateur a pu modifier le pouvoir neutralisant de l'immunsérum et l'inactiver partiellement, comme celà a pu être démontré dans le cas précédent de l'expérience avec le sérum de souris.

Si l'on examine maintenant la courbe gamma (virus/anti-G chauffé/SCF), on constate alors que la première partie accuse une accélération très intense de la neutralisation pendant les dix minutes initiales, et que le taux se maintient jusqu'à la fin de la réaction.

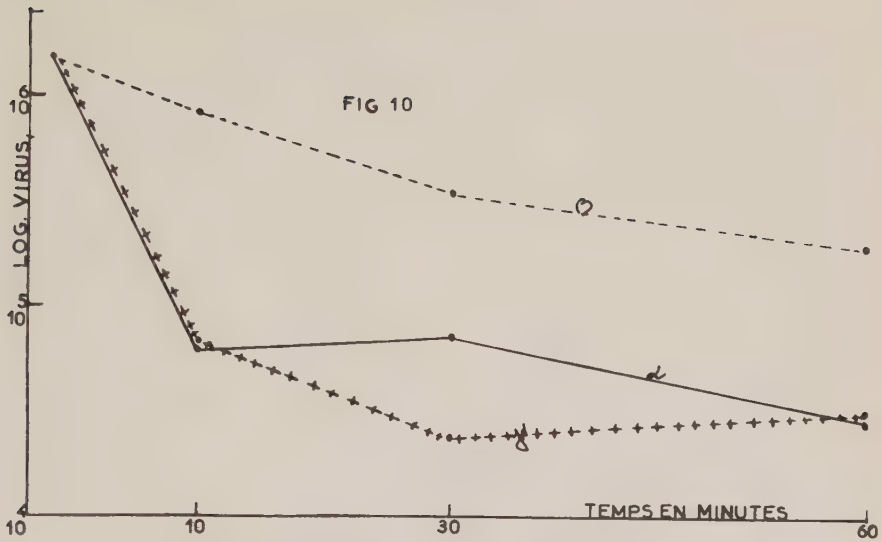
Quoique ayant pratiqué une seule expérience dans ces conditions, devant des effets aussi évidents, nous croyons pouvoir conclure pour ce type de sérum à la diminution du pouvoir neutralisant par la chaleur et à la restauration par l'adjonction du SCF, ce qui suppose la présence dans le sérum tardif de cobaye d'un facteur thermolabile nécessaire à l'action des anticorps.

Tableau 4

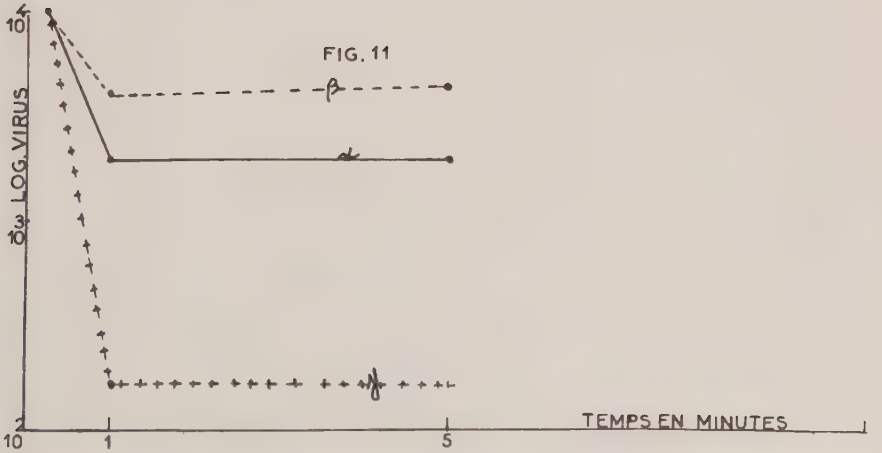
Indices de neutralisation

Expérience	Courbe	Indice à la première mesure	Indice à la fin de la réaction
1	alpha	0,96	0,68
	bêta	0,80	0,64
2	alpha	0,44	0,90
	bêta	0,70	0,70
3	alpha	1,20	1,36
	bêta	1,34	1,40
	gamma	1,20	1,38
4	alpha	1,65	2,26
	bêta	1,72	2,46
	gamma	1,84	2,66
5	alpha	0,51	0,74
	bêta	0,42	0,52
6	alpha	0,98	1,22
	bêta	1,06	1,00
7	alpha	1,02	1,26
	bêta	0,92	1,40
	gamma	1,40	1,40
8	alpha	0,84	0,62
	bêta	0,24	0,64
	gamma	1,06	0,74
9	alpha	0,40	0,98
	bêta	0,34	0,52
	gamma	1,00	1,00
10	alpha	0,20	0,26
	bêta	0,14	0,66
	gamma	0,96	1,36

Indice de neutralisation $\log(Vo/Vt) = \log Vo - \log Vt$

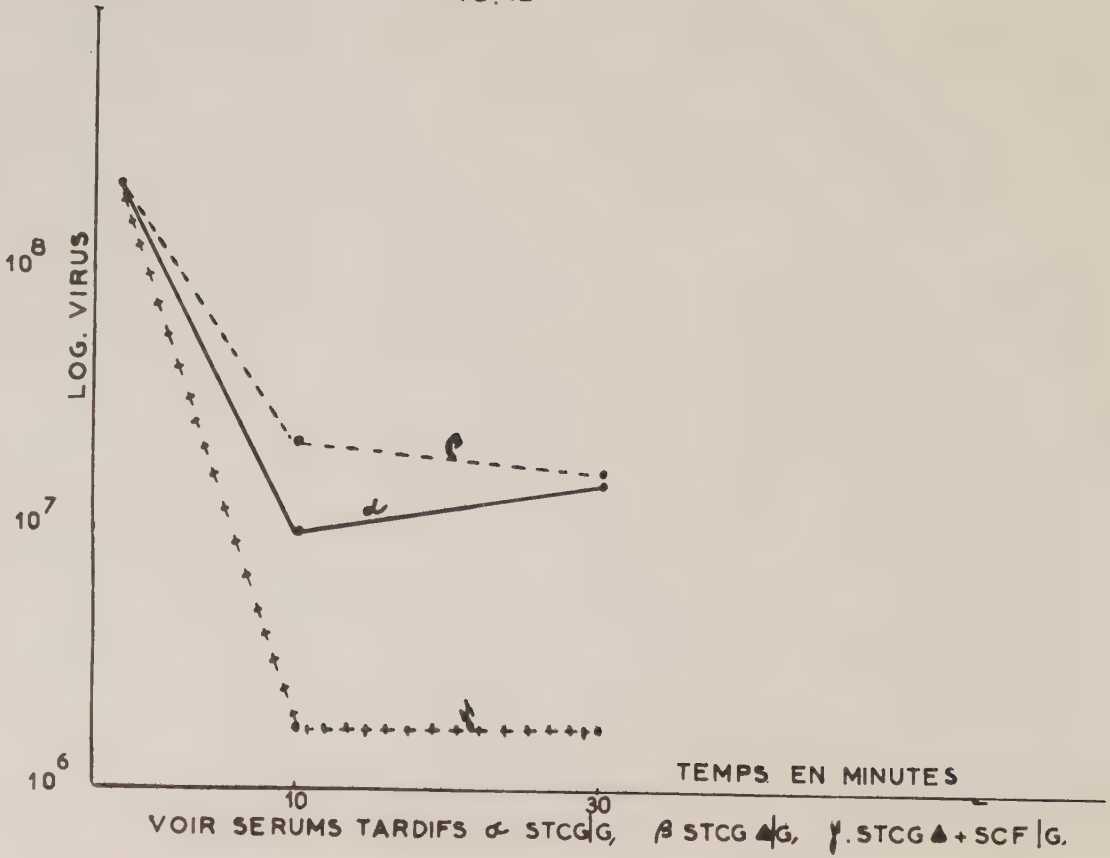


VOIR SERUMS TARDIFS. α. STSp|p β STSpΔ|p γ STSpΔ + SCF|p



VOIR SERUMS TARDIFS. α STSp|p β STSpΔ|p γ STSpΔ + SCF|p

FIG. 12


LOG. VIRUS
10^8
10^7
10^6
TEMPS EN MINUTES
10
30
VOIR SERUMS TARDIFS α STCG|G, β STCG▲G, γ. STCG▲+SCF|G.

Les figures 13, 14, 15 et 16 montrent les résultats d'expériences du type homologue suivant la technique 2, soit l'action d'un sérum *tardif de lapin* agissant selon trois modalités différentes. Dans deux cas de cette série les titrages ont été effectués après 10, 30 et 60 minutes, mais la partie la plus importante de la réaction se situant entre 10 et 30 minutes, nous n'avons pas été plus loin pour les autres cas.

En examinant chaque figure (13, 14 et 15), on voit que le comportement du sérum frais et chauffé est sensiblement équivalent. En effet, la première partie de la courbe montre une baisse très faible ou nulle dans tous les cas; dans la partie finale les courbes présentent des variations que l'on peut considérer comme négligeables. C'est une démonstration du faible pouvoir neutralisant des ces sérums qui contraste notamment avec celui des sérums de cobaye et des souris récemment prélevés.

En revanche, il faut noter l'allure très caractéristique de la courbe gamma (virus/immunsérum chauffé/SCF) où l'action neutralisante se manifeste d'une façon très intense par une chute rapide du titre et un niveau final très bas, toujours inférieur de 1 log. environ au titre initial.

Nous avons répété le même type d'expérience avec un sérum tardif anti-p vieilli six mois au réfrigérateur et nous avons obtenu pour chacune des courbes alpha, bêta et gamma une allure comparable à la série précédente. D'après les observations faites nous pouvons conclure à l'action nettement favorisante du SCF sur un sérum tardif de lapin frais ou vieilli. Cependant il est impossible d'affirmer que le chauffage ait une action quelconque sur des sérums frais.

Donc, les expériences montrent que *l'immunsérum de lapin* n'est pas affecté par le chauffage ou la conservation de longue durée et ne donne que de faibles titres de neutralisation. Cependant l'adjonction de SCF augmente considérablement à la fois la vitesse de réaction et le niveau final atteint. Si l'on compare ces immunsérums aux sérums de souris et de cobaye, il semble que le sérum de lapin tardif et frais se comporte de la même façon que les sérums chauffés des espèces mentionnées. Il faut rapprocher ce fait du faible taux en complément du serum de lapin.

d) CONCLUSIONS

De l'analyse des résultats exposés dans ce chapitre, on arrive à plusieurs conclusions qui seront considérées séparément pour chaque catégorie de sérum.

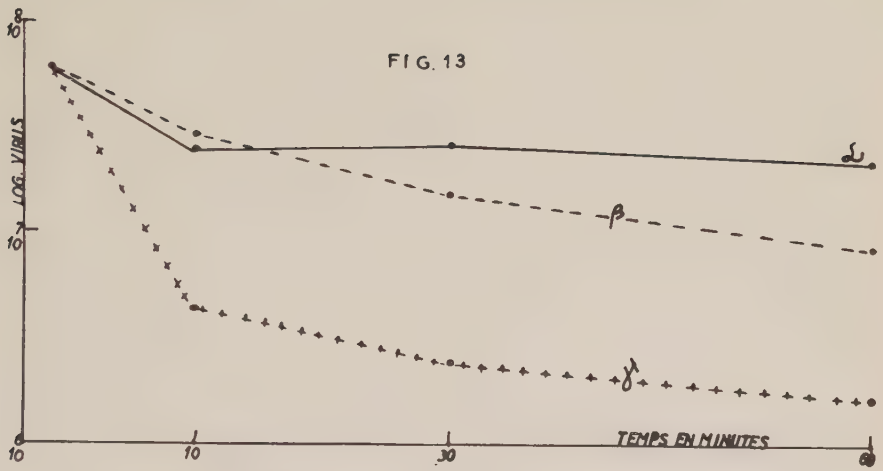
1 - SERUMS TRES PRECOCES

Les courbes de neutralisation obtenues selon la méthode 1 montrent des résultats semblables avec ou sans sérum normal frais, sauf dans une expérience réalisée avec le virus p et un sérum hétérologue G où il semble y avoir une faible différence. On ne peut donc pas conclure à une action favorisante du SCF sur le titre neutralisant dans le cas des immunsérums de lapin frais et récemment prélevés. Des résultats identiques ont été obtenus pour les mêmes sérums éprouvés selon la méthode 2: on retrouve dans toutes les expériences des résultats analogues, que la neutralisation ait lieu avec un immunsérum frais, chauffé ou chauffé et additionné du SCF. Autrement dit, il semble que les anticorps neutralisants présents dans un immunsérum *très précoce de lapin* n'ont pas besoin, pour agir, de facteurs accessoires présents dans le sérum de cobaye frais, puisque le taux neutralisant n'augmente pas lors de l'adjonction du SCF et que le chauffage n'exerce aucum effet sur le même sérum.

2 - SERUMS PRECOCES

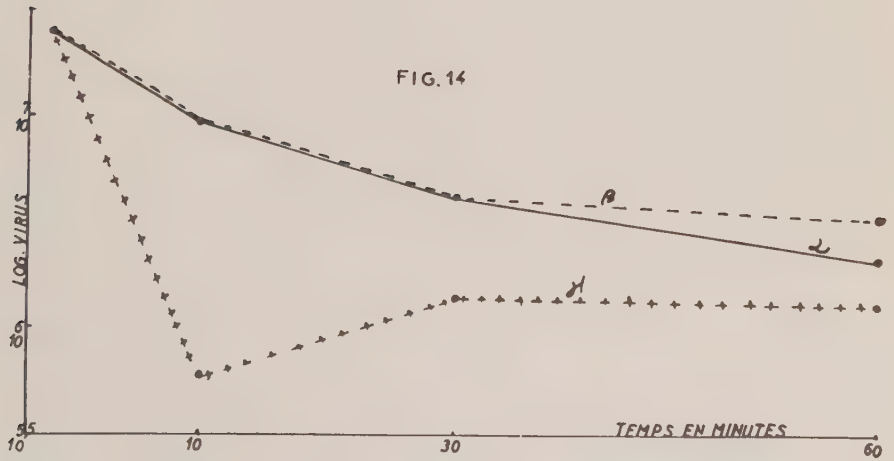
De même que dans le cas des sérums très précoces, les résultats des neutralisations de type homologue réalisées avec des immunsérums précoces de lapin suivant la méthode 1 ne présentent aucune différence attribuable à l'action du SCF. Pourtant quand on examine les résultats obtenus avec l'autre méthode (2) on arrive à des conclusions différentes. En effet, les trois courbes alpha, bêta et gamma représentant les trois différentes conditions de réaction sont essentiellement différentes. Les anticorps présents dans ce type de sérum nécessitent, pour neutraliser efficacement, la présence d'un facteur accessoire dont nous voyons en même temps qu'il est thermolabile. On arrive à des conclusions identiques pour un sérum de souris de la même catégorie. Il faut également remarquer que ce même sérum après vieillissement à $+4°C$ pendant six mois subit un abaissement de son pouvoir neutralisant apparent: ce qui nous indique que le facteur accessoire présent naturellement dans ce sérum lors de son prélèvement se détériore non seulement sous l'effet de la chaleur mais aussi par la conservation prolongée à $+4°C$.

FIG. 13



VOIR SERUMS TARDIFS. α STLG1G β STLG4 1 G γ STLG4 + SCF1G

FIG. 14



VOIR SERUMS TARDIFS. α STLG1G β STLG4 1 G γ STLG4 + SCF 1 G

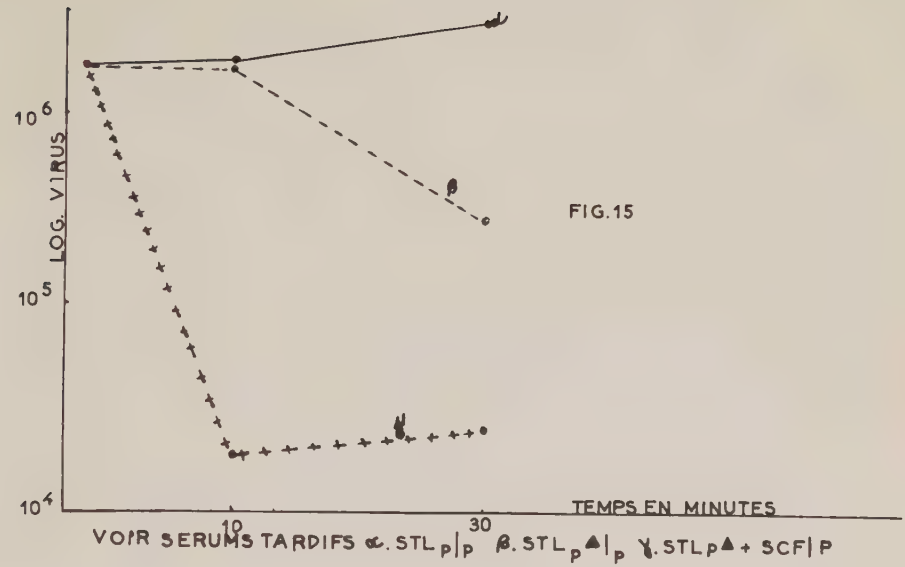


FIG.15

VOIR SERUMS TARDIFS α. STL$_p$|$_p$ β. STL$_p$▲|$_p$ γ. STL$_p$▲ + SCF|P

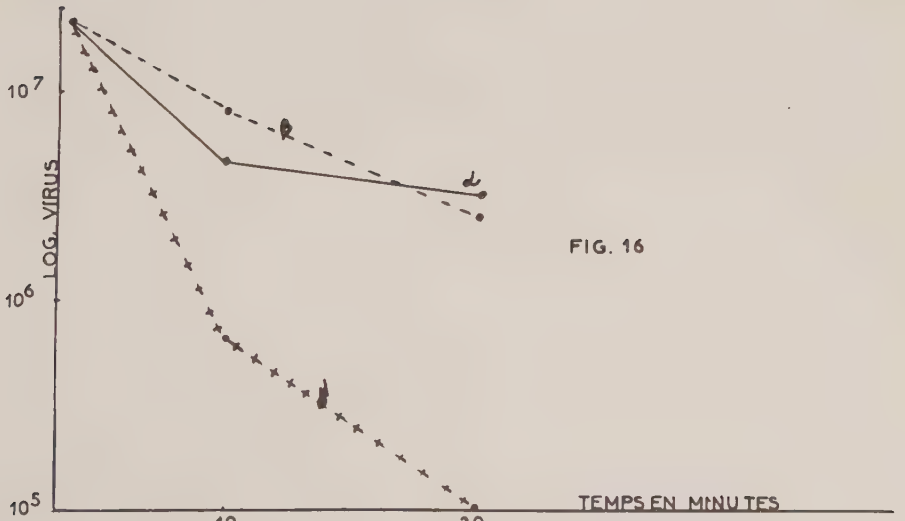


FIG. 16

VOIR SERUMS TARDIFS α. STLG|G β. STLG▲|G γ. STLG▲ + SCF|G

3 - SERUMS TARDIFS

Il nous reste à examiner les antisérums tardifs de diverses espèces qui peuvent être envisagés ensemble car ils ont des traits communs.

En effet, lorsque les sérums de lapin, de cobaye ou de souris récemment prélevés et inactivés par la chaleur sont utilisés en présence de SCF, la réaction de neutralisation est plus intense que si le même sérum agit seul, qu'il soit frais ou inactivé. Dans le cas de sérums de souris et du cobaye on a vu que le chauffage abaisse le titre neutralisant apparente du sérum, effet dû sans aucun doute à la destruction d'une substance de caractère thermolabile nécessaire à la neutralisation. Nous concluons à la présence dans les sérums de cobaye et de souris d'un facteur thermolabile qui peut être remplacé, s'il a été inactivé, par adjonction de sérum frais de cobaye (SCF) Mais ce facteur accessoire présent normalement dans les sérums de cobaye et de souris ne se détruit pas seulement par le chauffage à 56°C pendant 30 minutes: le fait que le sérum frais provoque une neutralisation plus forte lorsqu'il a été récemment prélevé nous oblige à admettre que le facteur accessoire est détruit par le vieillissement. Enfin nous avons pu rétablir le pouvoir neutralisant normal des immunsérums chauffés comme des immunsérums vieillis au moyen de SCF. Finalement il reste à examiner une particularité de l'action de l'immunsérum de lapin tardif dont le pouvoir neutralisant n'est pas modifié ni par la chaleur ni par la conservation à +4°C; lorsqu'on ajoute le SCF à ce sérum inactivé par la chaleur on note un accroissement net de la neutralisation. Autrement dit les anticorps sont dépendants de la présence du facteur accessoire à condition que celui-ci, qui ne parait pas naturellement présent dans le sérum soit introduit de l'extérieur dans la réaction. On sait d'ailleurs, que le sérum de lapin ne contient que peu de complément.

B

Séroneutralisation par la technique 3

avec des faibles concentrations des réactifs

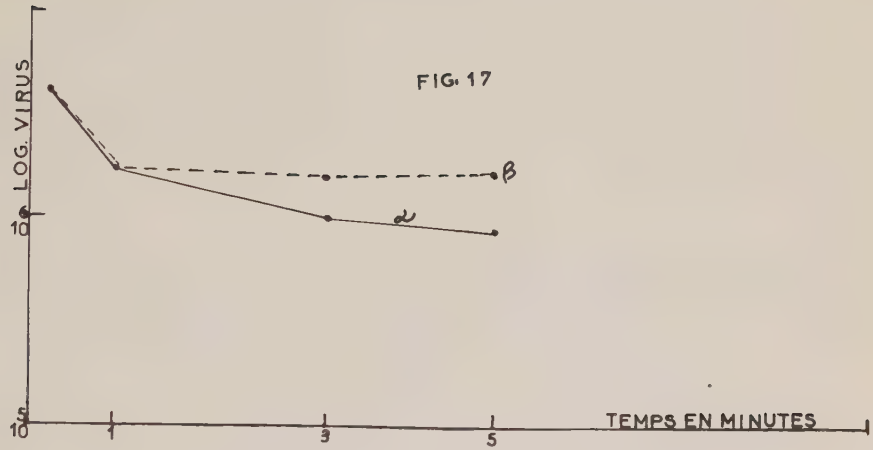
a) SOUCHE G (immunsérum tardif de lapin)

Cinq expériences ont été faites avec un immunsérum tardif anti-G selon le protocole 3 (cf. tableau 2), pendant 1, 3 et 5 minutes (fig. 17, 18, 19, 20 et 21).

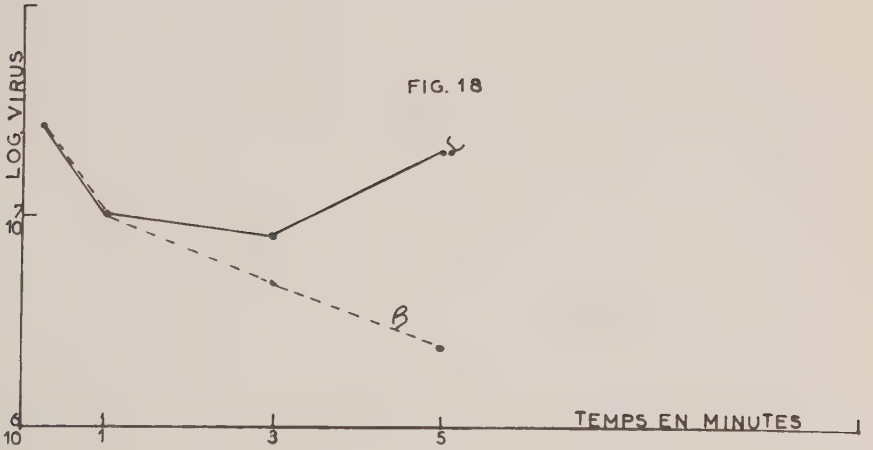
Dans quatre d'entre elles, la courbe qui représente le virus restant après le contact avec l'immunsérum en l'absence de SCF (alpha) descend moins vite que celle qui représente le même mélange en présence de SCF (bêta), accusant des différences de titre final de 0,2 à 1 log. Au bout de cinq minutes, la neutralisation obtenue en présence de SCF est importante. De plus, dans deux cas, la courbe alpha remonte, indiquant une réactivation partielle ou totale du virus après une première phase d'inactivation. Une cinquième expérience (fig. 17) n'a pas donné le même résultat, car la neutralisation a été très légèrement plus intense pour alpha.

Dans ces cas, les facteurs thermolabiles de l'immunsérum frais sont assez dilués pour que leur action puisse être considerée comme négligeable; on se trouve dans la même situation que dans les expériences de l'autre type (taux concentrés) avec du sérum chauffé. Seul intervient alors comme facteur accessoire le SCF ajouté.

Le phénomène décrit avec le premier type d'expérience (méthode 2) est donc retrouvé ici. Le pouvoir neutralisant des sérums tardifs est accru et la neutralisation est rendue moins reversible en présence des facteurs accessoires.

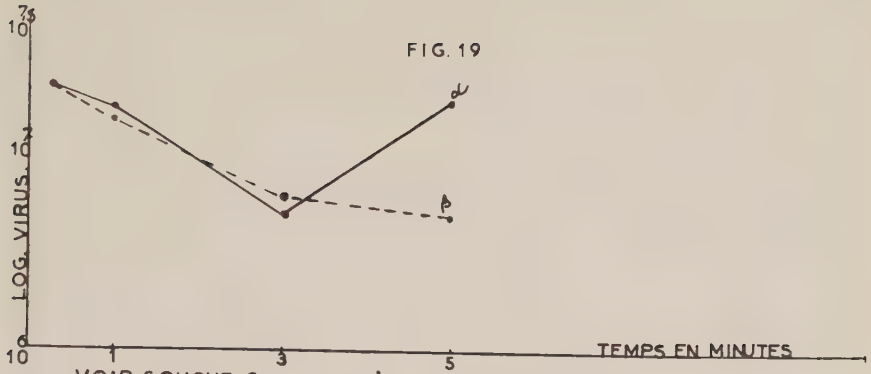


VOIR VIRUS SOUCHE G. α. STLG|G β. STLG+SCF|G



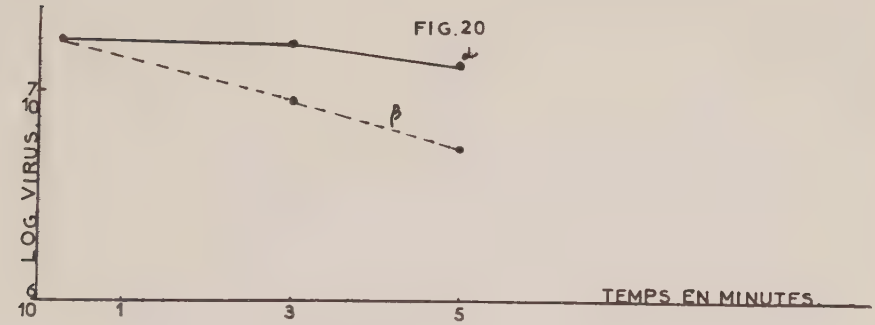
VOIR VIRUS SOUCHE G. α. STLG|G β. STLG+SFC|G

FIG. 19



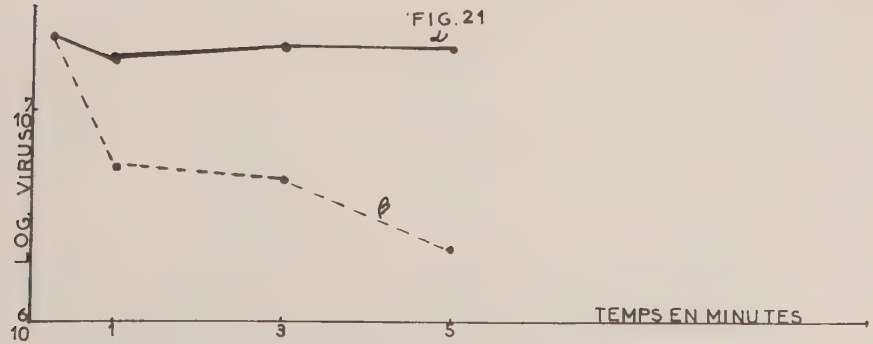
VOIR SOUCHE G. α. STLG|G β. STLG + SCF|G.

FIG. 20



VOIR SOUCHE G. α. STLG|G β. STLG + SCF|G

FIG. 21



VOIR SOUCHE G. α. STLG|G β. STLG + SCF|G.

Tableau 5

Indices de neutralisation

Expérience	Courbe	Indice à la première mesure	Indice à la fin de la réaction
11	alpha	0,43	1,07
	bêta	0,43	0,80
	gamma	1,60	1,30
12	alpha	0,0	-0,20
	bêta	0,02	0,54
	gamma	1,72	1,72
13	alpha	0,48	0,64
	bêta	0,24	0,74
	gamma	1,10	2,14
14	alpha	2,80	5,6
	bêta	2,40	2,40
15	alpha	0,44	0,14
	bêta	0,44	1,00
16	alpha	0,10	0,06
	bêta	0,18	0,60
17	alpha	0,0	0,09
	bêta	0,08	0,29
18	alpha	0,12	0,06
	bêta	0,6	1,02
19	alpha	0,15	0,40
	bêta	-0,16	0,10
20	alpha	0,25	0,40
	bêta	-0,10	0,60

Indice de neutralisation $\log(Vo/Vt) = \log Vo - \log Vt$

b) SOUCHE p (immunsérum tardif de lapin)

Lorsqu'on a pratiqué le même type d'expérience avec une autre variante du même virus (Sindbis souche p) et son sérum homologue on obtient des résultats sensiblement différents, (Fig. 22, 23, 24 et 25).

En ajoutant du SCF (courbe bêta), on assiste à un phénomène contraire à celui de la neutralisation: on observe en effet une augmentation du titre du virus, fait qui se manifeste très rapidement puisque le titre du virus atteint un maximum au bout d'une minute et baisse ensuite. Lorsqu'on n'ajoute pas de SCF, la neutralisation est très faible en raison de la haute dilution des anticorps, mais elle présente une allure normale dans tous les cas.

Devant ce résultat paradoxal, nous avons fait des expériences complémentaires (Fig. 26 et 27), pour étudier d'un peu plus près l'effet du SCF. Pour cela nous avons mis en présence. a) virus et immunsérum b) virus, immunsérums et SCF et c) virus et SCF seul.

En comparant les courbes, on constate que l'augmentation du titre du virus, lorsque l'on ajoute du sérum de cobaye frais, se manifeste de façon régulière et qu'elle peut dépasser 1 log. de différence. L'action de l'immunsérum sur le virus en l'absence de sérum de cobaye (alpha), provoque une neutralisation du même type que dans les fig. 22 et 23. La courbe qui décrit l'action du virus seul en présence de SCF (gamma), montre des caractéristiques assez particulières. D'abord elle monte très vite dépassant le niveau de la courbe bêta au bout d'une minute et se maintient presque jusqu'à la cinquième minute, indiquant une grande stabilité du titre du virus: on a donc ici seulement l'effet d'augmentation du titre, sans neutralisation.

Si l'on compare maintenant les courbes bêta et gamma, dont la différence provient seulement de la présence ou de l'absence de l'immunsérum, on voit que le titre augmente dans la première minute (bêta) puis s'abaisse au-dessous du titre initial, fait que nous attribuons à la présence des anticorps qui, après l'accroissement du taux viral, commencent à neutraliser le virus; par contre, la courbe gamma qui représente le mélange virus et SCF sans anticorps montre un titre élevé invariable pendant presque toute la durée de la réaction.

Des expériences du même type que celles qui ont été décrites pour l'immunsérum de lapin anti-p, ont eté réalisées avec un *immunsérum de souris,* selon la même méthode. Les résultats sont identiques. Avec le virus Sindbis souche p, le SCF additionné au mélange réactionnel provoque aussi une augmentation du titre du virus et nous n'avons pas pu utiliser ce système pour les mesures précises de neutralisation (Fig. 28 et 29).

La fig. 30 qui représente une expérience effectuée pour éclairer le phénomène, montre un résultat tout-à-fait identique à celui des expériences représentées dans les courbes 28 et 29 concernant le sérum de lapin tardif anti-p. Le virus est stimulé par le SCF et la courbe reste presque horizontale à partir du niveau qu'elle atteint en une minute, jusqu'à la fin de la réaction. La courbe bêta, en présence des anti-corps et SCF redescend après avoir atteint son maximun. Nous expliquons cette différence par le rôle des anticorps qui agiraient après un certain délai.

FIG. 22

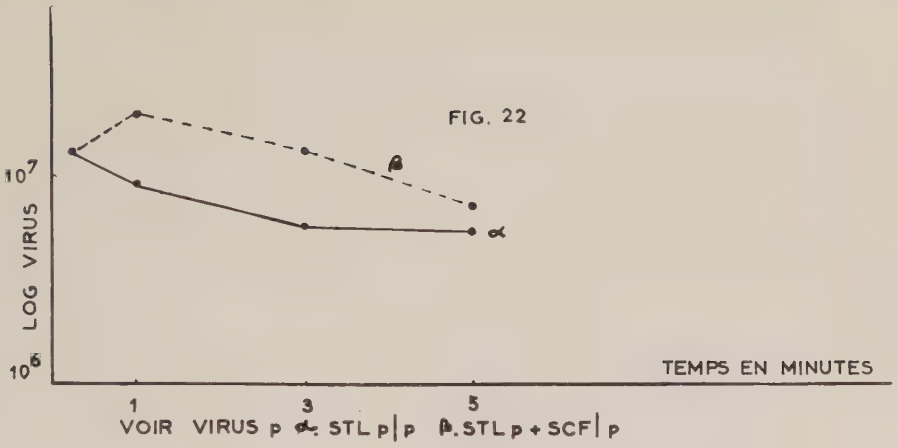


FIG. 23

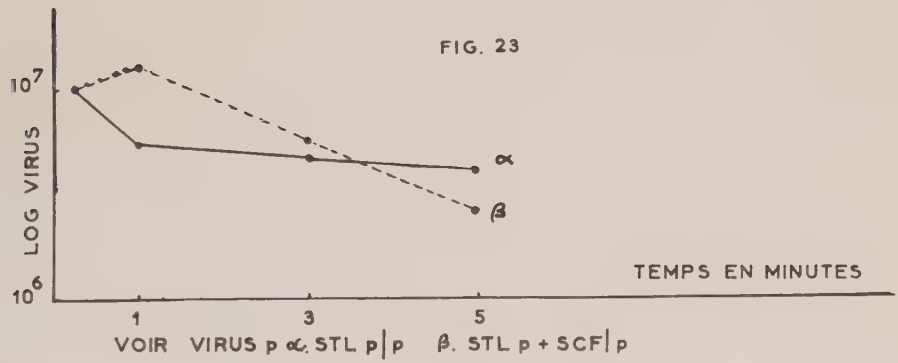
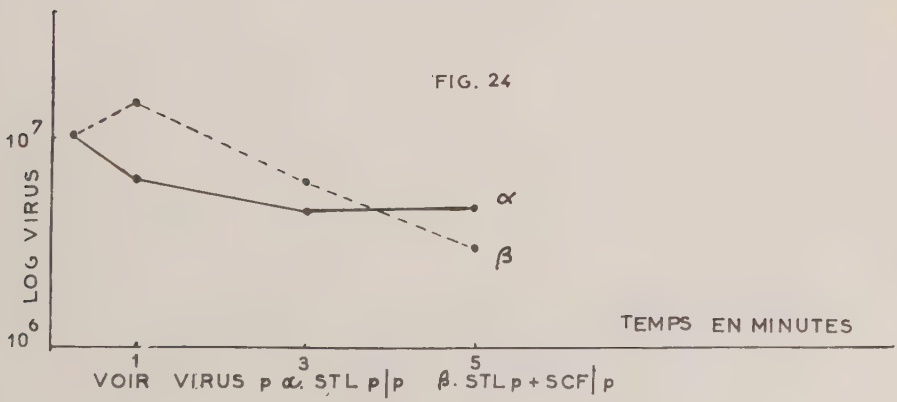


FIG. 24



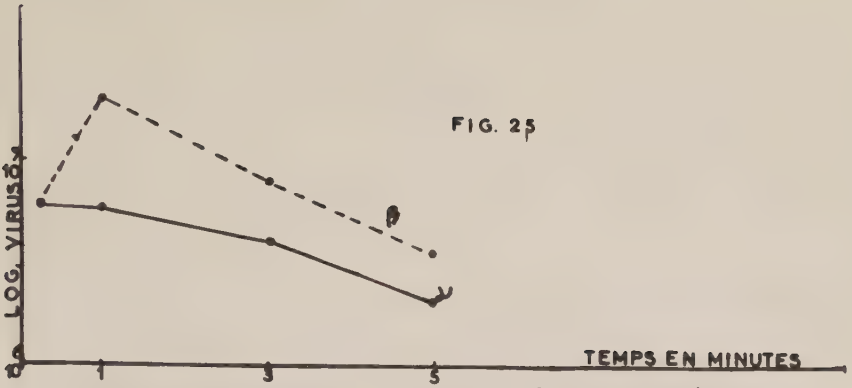


FIG. 25

VOIR VIRUS SOUCHE P. α. STLP|P. β. STLP + SCF|P.

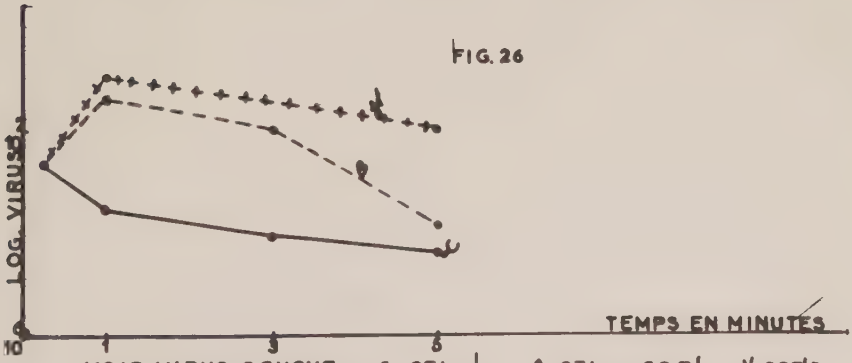


FIG. 26

VOIR VIRUS SOUCHE P. α. STLP|P β. STLP + SCF|P. γ SCF|P.

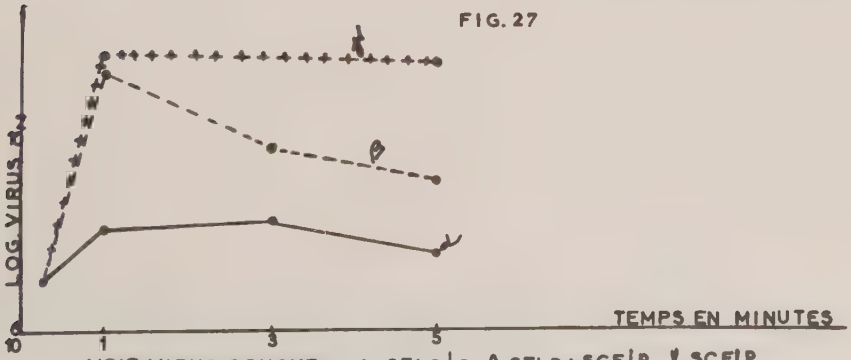


FIG. 27

VOIR VIRUS SOUCHE P. α. STLP|P β. STLP + SCF|P γ SCF|P.

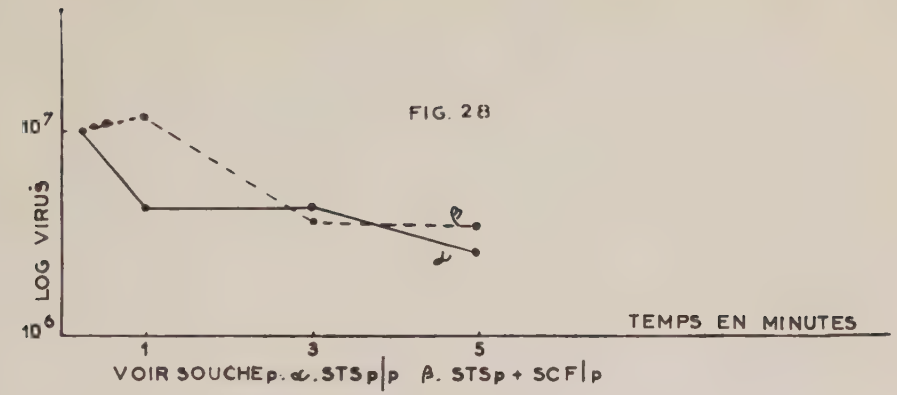


FIG. 28
LOG VIRUS
10^7
10^6
TEMPS EN MINUTES
1
3
5
VOIR SOUCHE p. α. STS p | p β. STS p + SCF | p

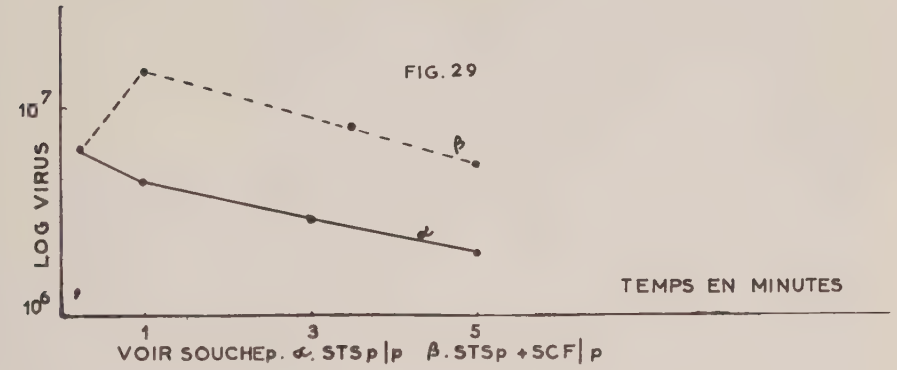


FIG. 29
LOG VIRUS
10^7
10^6
TEMPS EN MINUTES
1
3
5
VOIR SOUCHE p. α. STS p | p β. STS p + SCF | p

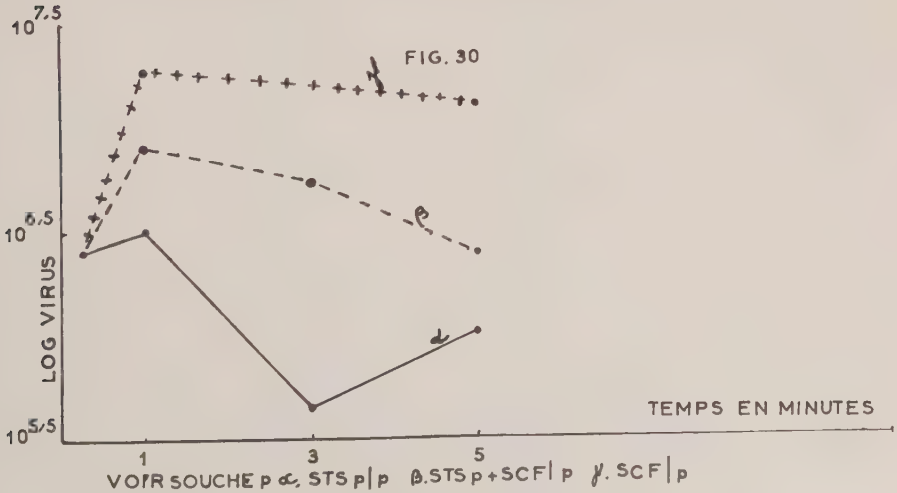


FIG. 30
LOG VIRUS
$10^{7,5}$
$10^{6,5}$
$10^{5,5}$
TEMPS EN MINUTES
1
3
5
VOIR SOUCHE p α. STS p | p β. STS p + SCF | p γ. SCF | p

Tableau 6

Indices de neutralisation

Expérience	Courbe	Indice à la première mesure	Indice à la fin de la réaction
21	alpha	0,20	0,34
	bêta	-0,16	0,54
22	alpha	0,04	0,50
	bêta	-0,50	0,26
23	alpha	0,22	0,45
	bêta	-0,32	0,27
	gamma	-0,40	-0,17
24	alpha	-0,27	-0,16
	bêta	-1,00	-0,50
	gamma	-1,10	-1,08
25	alpha	0,22	0,44
	bêta	-0,33	0,20
	gamma	-0,40	-0,20
26	alpha	0,36	0,60
	bêta	0,00	0,46
27	alpha	0,14	0,50
	bêta	-0,38	0,06
28	alpha	-0,10	0,40
	bêta	-0,50	0,00
	gamma	-0,88	-0,72
29	alpha	1,40	0,74
	bêta	0,26	0,87
	gamma	1,36	1,70
30	alpha	0,70	0,74
	bêta	0,40	0,36
	gamma	1,78	1,76
31	alpha	1,33	1,10
	bêta	0,86	1,00
	gamma	2,10	2,10

Indice de neutralisation log(Vo/Vt) = log. Vo-log. Vt

c) CONCLUSIONS.

Comme il a été dit par ailleurs, la méthode d'épreuve des mélanges sérum dilué-virus dilué répondait au besoin de rendre plus sensible le phénomène étudié. Il est normal que la neutralisation donnée par le sérum seul soit plus faible en valeur absolue que dans les expériences du type précédent. En effet, dans tous les cas examinés, tant avec la souche p qu'avec la souche G, la courbe alpha (virus/immunsérum) indique une neutralisation discrète avec une pente faible et un niveau final du titre du virus un peu au-dessous du titre initial.

En dehors de ce point commun à tous les sérums essayés, les autres faits présentent des caractéristiques assez particulières qui méritent d'être analysées séparément.

D'abord nous pouvons retenir les résultats obtenus en opérant avec le sérum anti-G de lapin. Dans ce cas, quand le sérum agit avec le concours du SCF, on obtient une neutralisation assez poussée.

Donc, le pouvoir neutralisant des sérums tardifs de lapin anti-G est accru par l'action du SCF et la neutralisation est rendue moins réversible, l'accrochage étant très fort. Autrement dit, nous pensons qu'un sérum répondant à ces caractéristiques a besoin pour exercer son action d'un facteur accessoire, qui, dans nos expériences est fourni par le sérum frais de cobaye normal (SCF).

Si nous utilisons des sérums tardifs de lapin ou de souris avec la souche p, il faut remarquer que la neutralisation est moins évidente qu'avec la souche G et que nous nous nous trouvons en présence d'un autre phénomène intéressant. En effet, lorsque le sérum dilué agit en présence du SCF, il y a une augmentation notable du titre viral, qui atteint son maximum dans la première minute de l'expérience et ensuite baisse lentement, avec une pente faible. Ayant voulu pousser plus loin les observations, nous avons introduit dans les expériences un nouveau couple constitué de virus + sérum de cobaye (SCF), qui est représenté par les courbes gamma. Cette fois-ci il n'y a rien de notable en ce qui concerne les courbes bêta et alpha; mais dans la courbe gamma, nous avons remarqué que le taux du virus montait au lieu de s'abaisser, ce qui semble imputable non à la présence de l'immunsérum, mais à la présence du SCF même. Jusqu'à ce moment nous n'avons pas d'explication à ce phénomène.

Enfin il faut noter un autre point intéressant: la différence entre les niveaux atteints après l'augmentation de titre du virus, selon qu'elle se pro-

duit en présence ou en l'absence d'anticorps. Dans le premier cas (courbe bêta) après l'élévation, il y a toujours une chute lente, tandis que, dans le deuxième (courbe gamma), la valeur du titre se maintient presque au même niveau, donnant une courbe sensiblement horizontale, ce qui indique que les anticorps, dans le cas bêta, neutralisent le virus liberé à la suite de l'interaction virus, sérum de cobaye.

C

Analyses des facteurs du complément

a) Etude de différentes fractions du complément.

Au cours des expériences réalisées et décrites dans les deux premières parties, on est parvenu à la conclusion que certaines catégories d'immunsérums contenaient un type d'anticorps neutralisant dépendant d'un facteur accessoire; nous avons aussi démontré que la plupart de ces sérums, lorsqu'ils sont utilisées peu de temps après le prélèvement et sans chauffage (sauf le sérum tardif de lapin), contiennent normalement ce facteur accessoire. Le facteur accessoire étant thermolabile, l'effet neutralisant total du sérum diminue sous l'action de la chaleur ou du vieillissement. Cependant, cette inactivation partielle disparait quand on ajoute au sérum chauffé du sérum de cobaye frais, lequel, comme on sait, présente un taux élevé de complément. C'est pourquoi nous avons été amenés à établir un rapport entre la substance présente naturellement dans l'antisérum frais et le complément, et par là à envisager un nouveau cycle d'expériences. Nous avons séparé les fractions thermolabiles du complément selon la technique décrite par Ecker et Pillemer (5) en deux fractions C^1 et C^2, contenant chacune deux éléments et nous avons étudié l'activité de chacune d'entre elles comme facteur accessoire en examinant parallèlement:

alpha : l'action de l'immunsérum chauffé seul,
bêta : l'action de l'immunsérum chauffé + le complément total,
gamma: l'action de l'immunsérum chauffé + "C^1" seule,
delta : l'action de l'immunsérum chauffé + "C^2" seule,
epsilon : l'action de l'immunsérum chauffé + "C^2" chauffée,
dzêta : l'action de l'immunsérum chauffé + "C^1 + C^2".

La fig. 31 se rapporte à une expérience avec le sérum tardif de cobaye anti-G et la souche G.

A noter d'abord que le sérum chauffé seul donne une faible neutralisation (dilution finale du sérum = 10^{-1}) : la pente s'abaisse lentement avec un indice de neutralisation de 0,2 log. à 10 minutes. La phase final à 30 minutes atteint 0,3 log. (courbe alpha). On observe comme prévu une augmentation de l'activité neutralisante de ce sérum lorqu'on ajoute du sérum frais de cobaye (courbe bêta), et la courbe de neutralisation montre alors une pente assez rapide, descendant jusqu'à 0,8 log. à 10 minutes pour remonter finalement à 0,5 log. à 30 minutes.

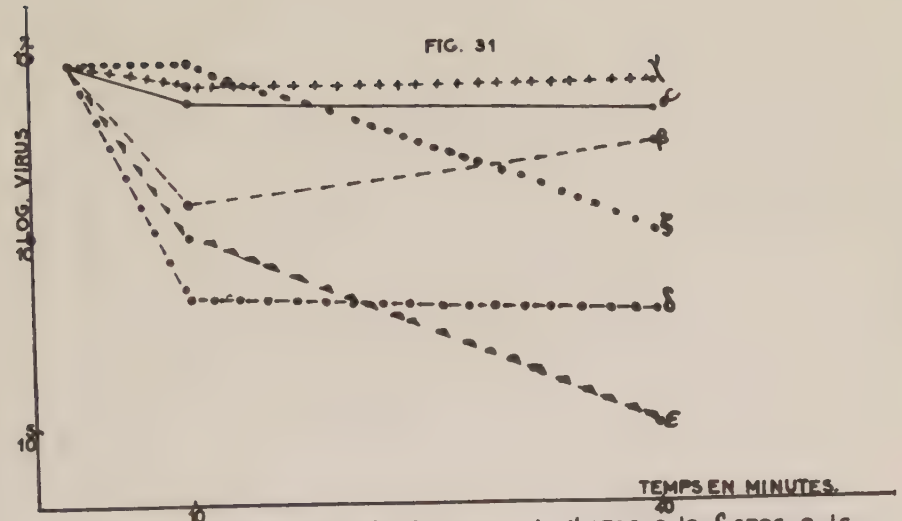
Lorqu'on ajoute la fraction "C^1" au sérum chauffé la courbe de neutralisation arrive aux valeurs de 0,2 et 0,5 log., c'est-à-dire que l'adjonction de cette fraction n'amène pas de différence sensible (courbe gamma). Au contraire si l'on utilise la fraction "C^2" toujours en présence d'immunsérum chauffé (courbe delta), on constate que dans les 10 premières minutes de la réaction, la courbe descend très rapidement en dépassant légèrement le niveau bêta (SCF) soit 1,1 log. pour terminer à 1,3 log. après 30 minutes.

Il était logique d'essayer ensuite le pouvoir des deux fractions réunies, en restaurant ainsi le complément original; le résultat est très proche de celui obtenu avec le complément normal, avec des indices de 0,8 log. et de 1,0 log. respectivement (courbe epsilon).

Il ressort de ces expériences que la fraction "C^2" parait responsable de l'augmentation du pouvoir neutralisant du sérum chauffé. Nous avons donc procédé à l'inactivation par chauffage de cette fraction (fig. 32); on constate que l'effet neutralisant de "C^2" a disparu et que la neutralisation est du même ordre que celle du sérum chauffé seul (0,1 et 0,2 log.).

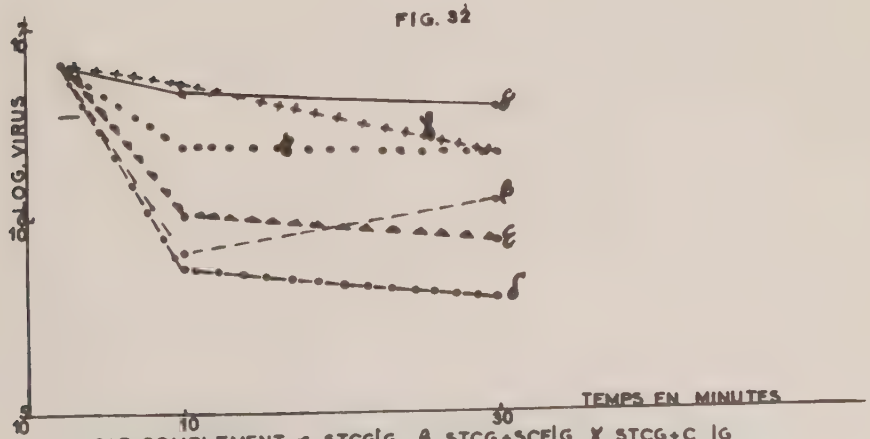
Le tableau 7 résume les résultats de quatre séries d'expériences semblables (Fig. 31, 32, 33 et 34) où nous avons utilisé séparément les facteurs décrits. A gauche nous donnons les valeurs du titre du virus restant après 10 minutes et à droite celles du titre après 30 minutes, ainsi que les valeurs moyennes.

FIG. 31

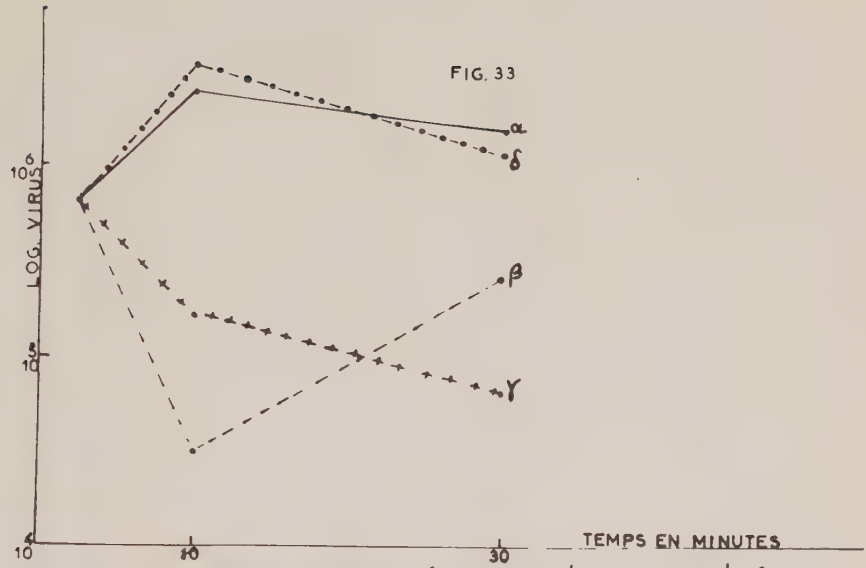


VOIR COMPLEMENT. α. STCG|G β. STCG+SCF|G γ. STCG+C_1|G δ STCG+C_2|G
ε. STCG+C_1|C_2|G ζ STCG+SCFA|C_1|C_2|G.

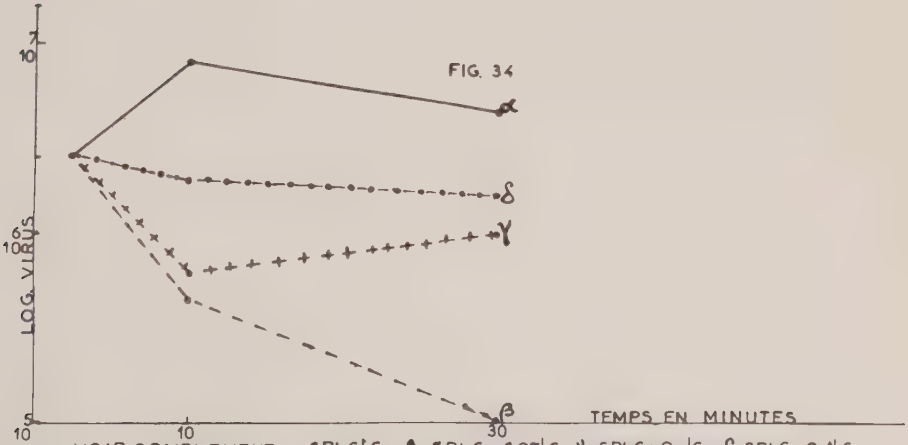
FIG. 32



VOIR COMPLEMENT. α. STCG|G β. STCG+SCF|G γ. STCG+C_1|G
ζ STCG+C_2|G ε. STCG+C_2A|G δ STCG+C_1|C_2|G.



VOIR COMPLEMENT. α STTCG/G β STTCG + SCF/G γ STTCG + C_2/G δ STTCG + C_2Δ/G.



VOIR COMPLEMENT. α SPLG/G. β SPLG + SCF/G. γ SPLG + C_2/G. δ SPLG + C_2Δ/G.

Tableau 7

Valeur des index de neutralisation

après 10 et 30 minutes de neutralisation

Courbe Virus/sérum	Après 10 minutes Expériences				M
	31	32	33	34	
alpha 0	0,19	0,25	-0,72	-0,49	-0,19
bêta C' total	1,03	0,78	1,31	0,75	0,97
gamma C'^1	0,44	0,20	non	non	0,32
delta C'^2	1,10	1,27	0,59	0,62	0,89
epsilon C'^2 inac.	non	non	-0,57	0,13	-0,22
dzêta $C'^1 + C'^2$	0,83	0,95	non	non	0,89

Tableau 7 (suite)

Valeur des index de neutralisation

après 10 et 30 minutes de neutralisation

Courbe Virus/sérum	Après 30 minutes Expériences				M
	31	32	33	34	
alpha 0	0,27	0,31	-0,26	-0,23	-0,22
bêta C' total	0,76	0,51	0,40	1,41	0,77
gamma C'^1	0,52	0,16	non	non	0,34
delta C'^2	1,26	1,35	1,00	0,41	1,00
epsilon C'^2 inac.	non	non	-0,39	0,21	-0,9
dzêta $C'^1 + C'^2$	0,96	1,95	non	non	1,45

Indice de neutralisation, log. (Vo/Vt) = log. Vo-log. Vt.
M = valeur moyenne.
non = non déterminée.

b) CONCLUSIONS.

Ces résultats sur l'action des différentes fractions du complément permettent des conclusions intéressantes sur la nature du facteur accessoire actif au cours de la neutralisation du virus Sindbis pour rendre cette inactivation plus intense et plus stable. En effet, comme il avait déjà été constaté dans les expériences précédentes, le chauffage diminue le pouvoir neutralisant d'un immunsérum par suite de l'inactivation d'un facteur accessoire thermolabile que nous avons retrouvé dans certains des immunsérums dont nous nous sommes servis. Ce facteur semble nécessaire à l'expression complète du pouvoir neutralisant. Le sérum de cobaye que nous avons utilisé dans notre travail pour fournir l'élément manquant aux immunsérums chauffés ou vieillis a sans doute rétabli le titre de neutralisation du sérum précédemment inactivé.

Il fallait alors tenter d'identifier le facteur apporté par le sérum frais de cobaye qui permettait de rendre son pouvoir initial à un sérum incomplet.

D'après nos premières expériences le facteur étudié est thermolabile et nous savons par ailleurs que des quatre éléments du complément, deux seulement ont cette propriété: C'^1 et C'^2. Nous avons donc fractionné le complément en deux parties, l'une contenant C'^1 et C'^3, que nous appelons ici "C'^1" et l'autre contenant C'^2 et C'^4 que nous appelons "C'^2". On peut penser que si une fraction thermolabile du complément est la cause du phénomène, son action proviendra respectivement, dans les deux fractions utilisées, de "C'^1" ou de "C'^2". Nous avons démontré que la partie renfermant C'^1 n'apporte aucune amélioration de la neutralisation par un immunsérum chauffé. Il faut donc admettre que l'activité du facteur accessoire dans le complément n'est pas due à la présence de C'^1 ni de C'^3.

Par contre, en utilisant la fraction thermolabile "C'^2" de la partie centrale, on obtient un pouvoir neutralisant égal ou même supérieur à celui du complément total, et cet effet disparait complètement par inactivation thermique, ce qui élimine la possibilité d'une intervention de C'^4.

Ces constatations nous amènent à la conclusion que la fraction C'^2 du complément est bien la seule responsable du rétablissement des propriétés thermolabiles d'un sérum qu'on a soumis à une température de 56°C pendant 30 minutes. Ayant mis en évidence qu'une longue conservation à +4°C détermine un effet analogue à celui de la chaleur, il est raisonnable de penser, bien que nous n'ayons pas tenté l'étude en séparant les différents facteurs dans ce cas que c'est le même constituant qui s'altère.

Finalement nous avons vérifié qu'en utilisant ensemble les deux fractions "C^1" et "C^2" le taux neutralisant ne semble pas modifié par la présence de C'^1, ce qui indique que l'activité du facteur accessoire n'est pas influencée par l'élément C'^1.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Dès 1925 Gordon (7) avec un sérum antivariolique démontra qu'un immunsérum chauffé subit une baisse de son pouvoir neutralisant.

Après les premières constatations, une série de travaux ont été poursuivis,, employant des virus très divers, mettant en évidence presque toujours le même phénomène: la réduction par le chauffage du pouvoir neutralisant des immunsérums. Ainsi, Mueller sur le sarcome de Rous (18), Morgan sur l'encéphalite équine de l'Ouest (17), Wittman sur le même virus (24), Leymaster et Ward (15) sur les oreillons, Dozois et coll. sur l'encéphalite équine de l'Ouest (2), Mc Carthy et coll. Sur la variole (16), Howitt sur le virus de la dengue (12), sont arrivés à la même conclusion. Il y a cependant quelques exceptions puisque d'autres auteurs comme Fox (6), Hashimoto et Prince (11), Sabin (19), n'obtiennent pas les mêmes résultats.

D'autre part, la plupart de ces travaux signalent la restauration du titre initial par adjonction de sérum frais, généralement du sérum de cobaye. Parmi les auteurs cités, Gordon (7) et Morgan (17) n'ont cependant pas réussi, ou seulement partiellement, à rendre par adjonction de sérum frais (7), (17), le pouvoir neutralisant disparu après chauffage.

Au cours de nos expériences avec des sérums de cobaye, de souris et de lapin à divers stades de l'immunisation, étudiés sur cultures d'embryon de poulet par la méthode des plages, nous avons pu tirer quelques conclusions au sujet de l'effet du chauffage sur le titre neutralisant d'un immunsérum. Nous avons pu montrer qu'un sérum "très précoce" de lapin, obtenu une semaine après une injection de virus, ne parait pas subir une diminution de son pouvoir neutralisant par chauffage. Par contre le sérum "précoce" de lapin, comme le sérum "tardif" de souris ou de cobaye, accusait une chute brusque de son titre neutralisant. Il était donc évident qu'au sein de ces sérums il y avait un composant qui avait été modifié par le chauffage. Un cas intéressant rencontré dans nos expériences était celui du sérum tardif de lapin, qui donnait avant ou après chauffage des taux de neutralisation peu différents.

De ces résultats, il semble ressortir qu'il existe des sérums dont le pouvoir neutralisant est l'expression de deux facteurs: les anticorps spécifiques et un deuxième facteur non-spécifique et thermolabile qui a été appelé couramment "facteur accessoire" ou "cofacteur". Dans les sérums "très précoces" que nous avons analysés, le chauffage, comme il a déjà été dit, ne joue aucun rôle. Le pouvoir neutralisant de l'immunsérum n'est pas augmenté par l'addition de sérum de cobaye frais ou chauffé, et il est raisonnable

de penser que les anticorps présents dans ce sérum sont indépendants du facteur accessoire.

Yoshino et coll. (25), avec le virus de l'herpès, ont trouvé que des sérums précoces de lapin ayant reçu une seule injection de virus présentaient une diminution de leur pouvoir neutralisant après chauffage; le titre était restauré par l'adjonction du complément. Les sérums tardifs par contre, en l'absence de complément, possèdent un pouvoir neutralisant important. Cependant, ce pouvoir est lui aussi intensifié par le complément ajouté. Ces auteurs interprètent l'observation par la présence de deux types d'anticorps qui ont besoin ou n'ont pas besoin de complément pour s'exprimer. Le sérum précoce contiendrait des anticorps dépendants du complément tandis que le sérum tardif posséderait des anticorps non dépendants. Nous croyons que dans les deux cas il s'agit des mêmes types d'anticorps, l'intensité de la neutralisation en l'absence de complément étant donnée exclusivement par le titre des anticorps, lequel est supérieur dans le sérum tardif. Mais les deux types de sérum contiennent bien à la fois des anticorps dépendants et non-dépendants du facteur accessoire. Des anticorps dépendants du complément ont aussi été trouvés par Toussaint et coll. (23) dans un "sérum normal" anti-phage. Cependant, ils considèrent que les anticorps des immunsérums contre le même système sont indépendants.

Pour les sérums tardifs de cobaye et de souris, nous avons vu que l'inactivation par la chaleur abaisse le pouvoir neutralisant, qui peut d'ailleurs être rétabli par l'adjonction de SCF. Il faut donc conclure que ces immunsérums sont dépendants d'un facteur accessoire normal et thermolabile, qui peut aussi être apporté par adjonction de sérum frais de cobaye.

Dans un seul cas représenté par un immunsérums de lapin tardif (deux injections en un mois), nous avons trouvé que les anticorps agissaient bien en l'absence du facteur accessoire propre de l'immunsérum lui-même. Pourtant, le même sérum inactivé additionné de complément présente une augmentation très importante de son taux neutralisant. Ce type de sérum que nous considérons comme tardif parait être du même type que l'immunsérum tardif de Yoshino et coll. (25). Cependant, nous croyons que l'effet nettement favorisant du SCF sur ce sérum indique la dépendance des anticorps du facteur accessoire. Le chauffage n'est pas le seul agent responsable de la perte partielle du pouvoir neutralisant. En effet les sérums de souris et de cobaye conservés plusieurs mois à $+4^{o}C$ subissent aussi une baisse du titre neutralisant semblable à celle provoquée par le chauffage.

Gordon (7), Morgan (17), avaient déjà fait cette remarque et la deuxième avait réussi à restaurer le pouvoir perdu par l'adjonction du sérum; cependant elle ne réussit pas à rendre le pouvoir perdu par suite du chauffage. Nous avons observé avec des sérums tardifs de cobaye et de souris que le titre neutralisant diminuait de la façon signalée par Morgan. Nous avons pu rétablir dans tous les cas le pouvoir total en ajoutant du sérum frais de cobaye. Il faut noter donc que le facteur accessoire présent normalement dans quelques immunsérums ressemble beaucoup au complément, car comme le complément, il est détruit par le chauffage et la conservation à $+4^{o}C$.

Morgan (17), Wittman (24), Leymaster (15), Sabin (20), Howitt (12), à propos de l'effet favorable du sérum frais (presque toujours de cobaye) avaient émis l'idée que le facteur responsable de la réactivation pourrait bien être le complément. De plus Howitt soutenait que la fraction C'^2 du complément, qui est thermolabile et qui est d'ailleurs présente à différents taux selon l'origine du complément, pourrait être elle-même le facteur accessoire intervenant à côté des anticorps. Néanmoins, Mc Carthy (16), n'acceptait pas l'idée que ce soit le complément qui joue un rôle si important; il démontra en utilisant des sérums frais avec des taux variables de complément qu'il n'y avait pas de relation entre ce taux et l'intensité de l'action. Dozois et coll. (2), avec le complément fractionné de lapin ont trouvé que la fraction C'2 montrait le même pouvoir favorisant que le complément total. Ils ont vu aussi, qu'une amélioration partielle était due aux composants C'^3 et C'^4, mais nous croyons ces résultats discutables car les fractions C'^3 et C'^4 utilisées contenaient aussi les composants C'^1 et C'^2. L'action observée s'explique donc aussi bien par la présence de C'^2.

Nous avons essayé l'action du complément de cobaye fractionné en deux parties contenant l'une $C'^1 + C'^3$ (C^1) et l'autre $C'^2 + C'^4$ (C^2). La justification d'un tel fractionnement se trouve dans le fait que parmi les quatre éléments du complément, seul C'^1 et C'^2 sont thermolabiles, et que le facteur accessoire disparait après le traitement par la chaleur. On peut donc penser que l'action étudiée proviendrait de l'un ou l'autre des composants thermolabiles du sérum. Nous avons obtenu une restauration totale du pouvoir neutralisant normal d'un immunsérum inactivé en ajoutant la fraction C^2. Par contre, en présence de la fraction C^1, il n'y avait pas de modification du taux neutralisant de l'immunsérum inactif et l'ensemble de C^1 et C^2 ne provoquait pas une meilleure neutralisation que C^2 employée seule.

Nous croyons que la disparition du pouvoir d'activation propre de la fraction "C^2" après le chauffage confirme entièrement l'importance de celle-ci comme facteur accessoire des anticorps neutralisants.

Ainsi peut-on penser qu'il existe des sérums neutralisants dépendants et non-dépendants du complément (C'^2). L'action favorisante se manifesterait pour les anticorps dépendants par l'action du complément contenu dans l'immunsérum lui-même (facteur accessoire interne) ou bien, en son absence, par le facteur accessoire ajouté sous forme de sérum frais.

Enfin, quoique l'identification de la fraction ait été faite sur du complément de cobaye, il faut admettre que la fraction présente normalement dans les sérums considérés, doit être identique ou très proche de la fraction C'^2.

Il faut remarquer que les immunsérums sont toujours employés après un chauffage qui a pour but de détruire d'éventuels facteurs inhibiteurs de la séroneutralisation de nature thermolabile. Il est donc souhaitable de rajouter du facteur accessoire nécessaire à la neutralisation, en l'occurence une fraction du complément que l'inactivation a fait disparaitre. L'adjonction d'un sérum normal frais peut réaliser cet apport.

Au cours de ces dernières années on a décrit des anticorps qui ont des vitesses de sédimentation distinctes en raison de leur nature chimique; peut-être faut-il chercher dans cette différence chimique la raison de la différence de comportement des anticorps vis-à-vis du facteur accessoire.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS GENERALES

La neutralisation s'est révélée comme l'une des techniques les plus utiles en virologie; d'abord practiquée sur oeuf embryonné ou sur les animaux de laboratoire, la mise au point des cultures cellulaires en fit un outil à la fois plus sensible et plus maniable et permit par là une série d'études qui n'étaient pas possibles avec les anciennes méthodes. Parmis les nombreux problèmes soulevés par son emploi, le rôle des facteurs dits "accessoires" ou "cofacteurs" fait l'objet de cette étude.

La neutralisation du pouvoir infectieux est en premier lieu due à l'action des anticorps spécifiques présents dans un immunsérum, mais il apparait que d'autres éléments accessoires interviennent de manière sensible au cours de l'interaction virus-anticorps.

Les études cinétiques que nous avons effectuées sur cultures de cellules d'embryon de poulet avec les deux variantes connues du virus Sindbis souche p à petites plages et souche G à grandes plages, nous ont permis un

certain nombre d'observations; en effet, lorsque la neutralisation était pratiquée avec un sérum frais, la courbe représentant la survie du virus à des temps différents offrait une allure très distincte de la courbe obtenue en utilisant un sérum chauffé. Une différence analogue se manifestait entre les courbes de neutralisation produites par un immunsérum frais d'une part et par le même sérum conservé longtemps à +4°C d'autre part. *On pouvait en déduire que l'immunsérum se détériorait puisque le pouvoir neutralisant accusait une baisse perceptible.*

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons ajouté aux mélanges virus-sérum immun du sérum de cobaye frais, lequel est riche en complément, et constaté que la courbe de neutralisation des immunseérums affaiblis par le chauffage ou par vieillissement se rétablissait au niveau des sérums actifs: *nous avons donc démontré l'existence dans le sérum immun d'un facteur détruit par la chaleur et par la conservation de longue durée à la température de +4°C qui agissait en même temps que les anticorps spécifiques pour annuler le pouvoir infectieux du virus.* En analysant des sérums provenant de différents animaux, nous avons trouvé que l'importance de ce facteur dépend de l'espèce animale utilisée et du degré d'immunisation de l'animal au moment de la price de sang. La présence de ce facteur qui améliore le pouvoir neutralisant semble le plus souvent nécessaire à l'expression des anticorps. Ainsi, sur la base d'une action complémentaire de ce facteur qui peut être présent naturellement dans le sérum, il est évident qu'il existe deux types d'anticorps neutralisants: anticorps dépendants du facteur accessoire et anticorps non-dépendants. Des immunsérums que nous avons examinés, seul le sérum "très précoce" de lapin n'était pas modifié par un facteur accessoire et thermolabile; les autres sérums considerés comme "précoces" ou "tardifs", de la même espèce ou d'autres, présentaient un taux variable de facteur accessoire propre ou bien étaient sensibles à l'effet d'un facteur accessoire externe. *Nous croyons donc que le premier groupe d'immunsérums peut être considéré comme contenant des anticorps non-dépendants d'un facteur accessoire, tandis que le deuxième groupe représente des anticorps dépendants du facteur accessoire.*

Un phénomène curieux s'est manifesté exclusivement entre la variante p du virus Sindbis et le sérum homologue, lorsqu'on réalisait la neutralisation en utilisant le virus dilué à 10^{-4} et le sérum immun à 1/5 de 10^{-3}. En effet, il y avait une augmentation de titre viral à la suite du mélange du virus, de l'immunsérum et du facteur accessoire contenu dans le sérum frais de cobaye. Le phénomène était momentané car ensuite le titre redescendait. Nous avons trouvé la cause de ce phénomène dans l'action du sérum

frais de cobaye, car si l'on supprime l'immunsérum, on a toujours l'augmentation de titre, avec cette fois un niveau stable.

Finalement en utilisant le complément séparé en deux fractions dont l'une conserve le composant C'^1 et l'autre C'^2 nous avons mis en évidence que:

a - la fraction, C'^1 seule n'a aucune action;

b - la fraction C'^1 en présence de C'^2 ne modifie en rien l'action de cette fraction;

c - la fraction C'^2 perd toutes ses propriétés si elle est inactivée à 56°C pendant 30 minutes;

d - la partie thermolabile C'^2 du complément renferme le facteur accessoire.

2

Donc, le facteur accessoire normalement présent dans l'immunsérum, ou celui apporté par un sérum normal frais ajouté, s'identifie à la fraction C'^2du complément.

Il agit d'abord en accélérant la vitesse de neutralisation et aussi en intensifiant le pouvoir neutralisant, ce que la courbe de neutralisation exprime par une pente plus rapide et un niveau final plus bas. La combinaison antigène-anticorps semble, en la présence du facteur accessoire, plus rapide et plus stable.

Enfin, à propos de l'utilisation dans la réaction de neutralisation des sérums qui contiennent des anticorps dépendants du facteur accessoire, il faut faire deux remarques d'importance pratique:

a) au cours de titrages d'un immunsérum, il semble souhaitable d'inactiver le sérum et d'ajouter à chacune des dilutions une quantité donnée de facteur accessoire externe, puisque la dilution du sérum entraine aussi la dilution du facteur accessoire qu'il peut contenir.

b) lorsqu'il s'agit de comparer le pouvoir neutralisant des sérums préparés sur différents animaux, il faut opérer de même puisque chaque animal possède dans son sérum un taux variable de facteur accessoire, taux qui est d'ailleurs inconnu.

BIBLIOGRAPHIE

1—CLARKE, D. H. et CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1958, *7*, 561.

2—DOZOIS, T. F., WAGNER, J. C., CHEMERDA, C. M. et ANDREW, V. M., The influence of certain serum factors on the neutralization

of Western equine encephalomyelitis virus, *J. Immunol.*, 1949, *62*, 319-331.

3—DULBECCO, R. et VOGT, M., Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *J. exp. Med.*, 1954, *99*, 167-182.

4—DULBECCO, R., VOGT, M. et STRICKLAND, A. G. R., A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western equine encephalomyelitis virus and poliomyelitis virus, *Virology*, 1956, *2*, 162-205.

5—ECKER, E. et PILLEMER, L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1942, *43*, 63.

6—FOX, J. P., The neutralization technique in Tsutsugamushi disease (scrub typhus) and the antigenic differenciation of Rickettsial strains, *J. Immunol.*, 1949, *62*, 341-352.

7—GORDON, M. H., Studies of the viruses of vaccinia and variola, *Med. Res. Council (Brit.), special report*, 1925, Ser. 98.

8—GINSBERG, H. S. et WEDGWOOD, R. J., Properdin and inactivation of viruses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, *83* 528-532.

9—HANNOUN, C. et PANTHIER, R., Application de la méthode des plages en cultures cellulaires à l'étude du virus-vaccin amaril 17 D., *Bull. Soc. Path. exot.*, 1960, *53*, 424-430.

10—HANNOUN, C., ASSO, J. et ARDOIN, P., Mutants à petites plages du virus Sindbis, *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, *107*, 598-603.

11—HASHIMOTO, N. et PRINCE, A., Kinetic studies on the neutralization reaction between Japanese encephalitis virus and antiserum, *Virology*, 1963, *19* 261-272.

12—HOWITT, B. F., A non specific heat-labile factor in the serum neutralization test for Newcastle disease virus, *J. Immunol.*, 1950, *64* 73-84.

13—KARSON, D. et BUSSELL, R., Studies of non-specific inactivation of Newcastle disease virus by mammalian sera, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, *83*, 539-550.

14—LEPINE, P., DANIEL, PH., PACCAUD, M. et SLIZEWICZ, P., Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés, *Ann Inst. Pasteur*, 1956, *90*, 654.

15—LEYMASTER, G. R. et WARD, T. G., The effect of complement in the neutralization of mumps virus, *J. Immunol.*, 1949, *61*, 95-105.

16—Mc CARTHY, K. et GERMER, W. D., Two heat-labile factors in normal sera wich neutralize variola virus, *Brit. J. exp. Path.*, 1952, *33*, 529-536.

17—MORGAN, I. M., Quantitative study of the neutralization of Western equine encephalomyelitis virus by its antiserum and the effect of complement, *J. Immunol.,* 1954, *50,* 359-371.

18—MUELLER, J. H., The effect of alexin in virus-antivirus mixtures, *J. Immunol.,* 1931, *20,* 17-23.

19—SABIN, A. B., The mechanism of immunity to filterable viruses. I. Does the virus combine with the protective substance in immune serum in the absence of tissue, *Brit. J. exp. Path.,* 1935, *16,* 70-84.

20—SABIN, A. B., The dengue group of viruses and its family relationships, *Bact. rev.,* 1950, *14,* 225-232.

21—SOUTHAM, C. M. et GREENE, E. L., Lack of effect of properdin system on West Nile and Mengo viruses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1959, *83,* 533-538.

22—STIK, B., Cofactor and specific antibodies against influenza virus, *Acta .....virol.,* 1962, *6,* 327-337.

23—TOUSSAINT, A. J. et MUSCHEL, L. H., Studies on the bacteriophage neutralizing activity of serums. I. An assay procedure for normal antibody and complement, *J. Immunol.,* 1962, *89,* 27-34.

24—WITMAN, L., The neutralization of Western equine encephalomyelitis virus by human convalescent serum. The influence of heat-labile substances in serum on the neutralization index, *J. Immunol.,* 1947, *56,* 97-108.

25—YOSHINO, K. et TANIGUCHI, S., The appearance of complement-requiring neutralizing antibodies by immunization and infection with herpes simplex virus, *Virology,* 1964, *22,* 193-201.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"D. N. A. mitochondrial".

Vu et approuvé :

Paris, le 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu, et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE